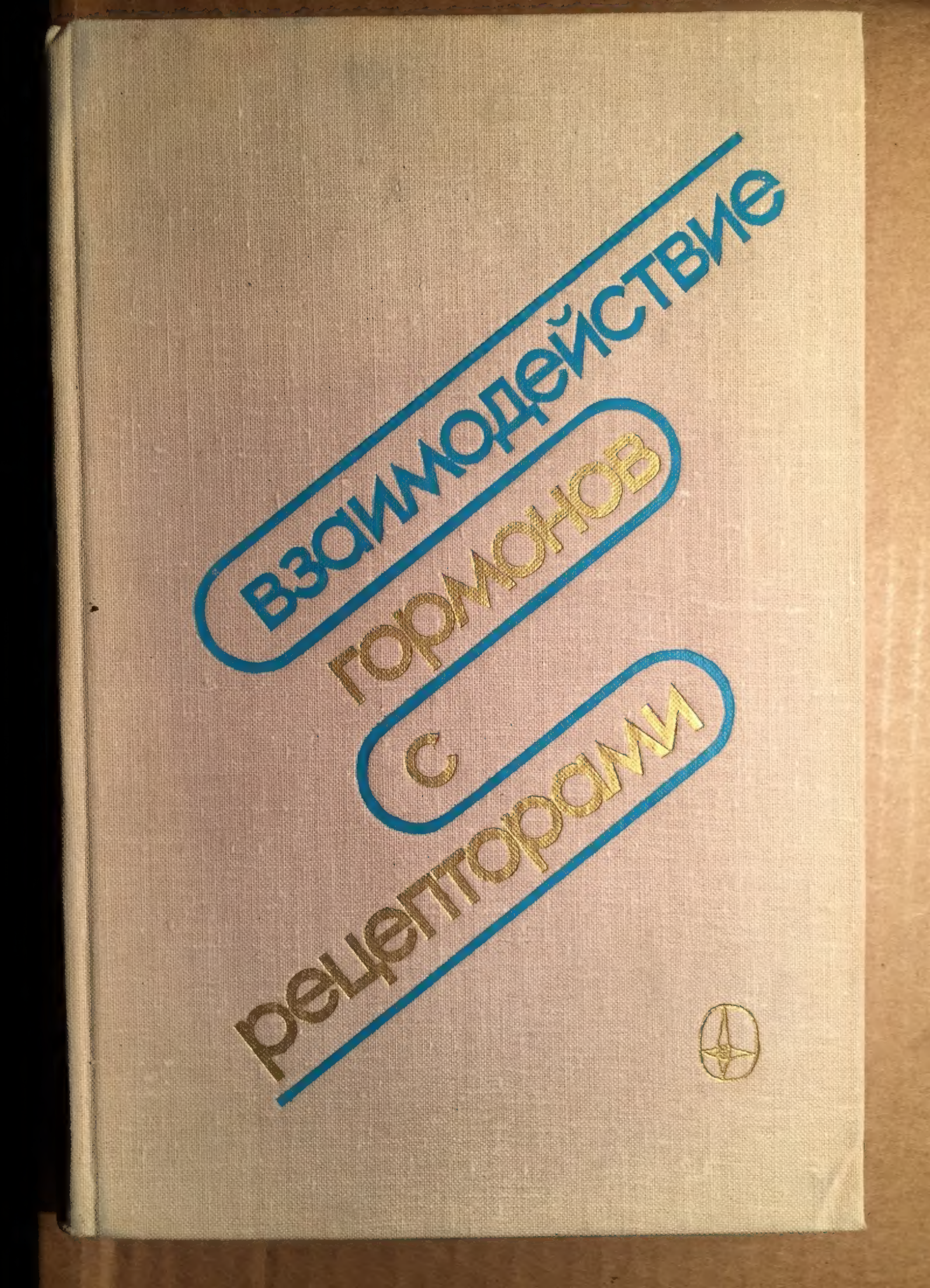
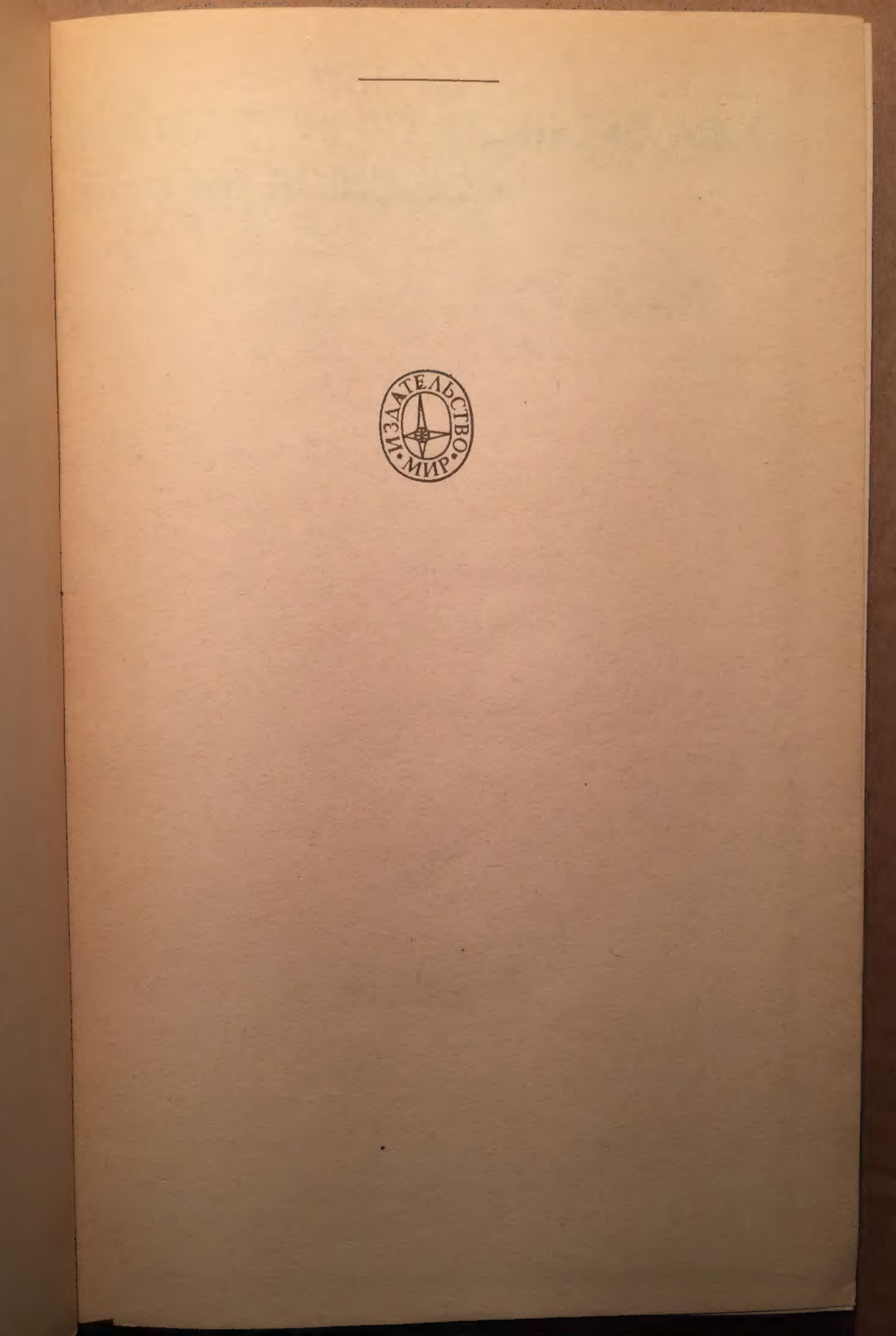

взаимодействие
гормонов
с
рецепторами


ИЗДАТЕЛЬСТВО
МИР

# HORMONE-RECEPTOR INTERACTION MOLECULAR ASPECTS

Edited by GERALD S. LEVEY

Department of Medicine University
of Miami School of Medicine Miami, Florida

Marcel Dekker, Inc. New York and Basel

# ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГОРМОНОВ С РЕЦЕПТОРАМИ

Молекулярные аспекты




Под редакцией Дж. ЛЕВИ

Перевод с английского

канд. биол. наук А. Н. Смирнова и
канд. биол. наук З. Ф. Утешевой

под редакцией проф. В. Б. Розена

Издательство «МИР» Москва 1979

УДК 577.17

Фундаментальная коллективная монография посвящена молекулярным аспектам гормон-рецепторного взаимодействия. Глубокое влияние гормонов на все виды обмена веществ в организме и на многие его другие функции в большой мере определяется их взаимодействием с особыми рецепторными белками, присутствующими в органах-мишенях. В книге достаточно полно и на самом современном уровне рассмотрена рецепция белковых, пептидных, стероидных, тиреоидных гормонов, простагландинов и медиаторов. Подчеркивается роль циклических нуклеотидов в рецепции ряда гормонов.

Предназначена для эндокринологов, физиологов, биохимиков, молекулярных биологов, онкологов.

*Редакция литературы по биологии*

2605070000

В $\frac{21005-117}{041(01)-79}$ 117—79

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Под редакцией Дж. Леви

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГОРМОНОВ С РЕЦЕПТОРАМИ

Ст. научн. ред. Л. Г. Тер-Саркисян и научн. ред. Т. И. Жиляева
Младший редактор О. А. Горгун
Художник А. Семенов. Художественный редактор Б. Н. Юдкин.
Технический редактор Н. И. Борисова. Корректор В. С. Соколов

ИБ № 1546

Сдано в набор 12.02.79. Подписано к печати 03.07.79. Формат 60×90$^{1}/_{16}$. Бумага типографская № 2. Гарнитура латинская. Печать высокая. Объем 13,5 бум. л. Усл. печ. л. 27. Уч.-изд. л. 30,23. Изд. № 4/9936. Тираж 5300 экз. Зак. № 882. Цена 3 р.

Издательство «Мир»

Москва, 1-й Рижский пер., 2

Владимирская типография «Союзполиграфпрома» при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли
600000, г. Владимир, Октябрьский проспект, д. 7

## ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРА ПЕРЕВОДА

Гормон-рецепторное взаимодействие представляет собой одну из наиболее актуальных проблем современной эндокринологии. Исследования последних лет показали, что на путях реализации гормонального эффекта в клетке начальным, необходимым и ключевым этапом является взаимодействие гормона со специфическим рецепторным белком (или белками). По современным представлениям, белок-рецептор — это «двухвалентная» в функциональном отношении субклеточная структура, с одной стороны, обусловливающая дискриминированный прием гормонального сигнала, а с другой — инициирующая специфические гормональные эффекты, переводя принятый сигнал на язык метаболизма клетки-мишени. Установлено, что рецепторы белковых и пептидных гормонов, ряда тканевых гормонов и нейромедиаторов расположены на наружной поверхности плазматической мембраны и, следовательно, они узнают соответствующий внеклеточный сигнал с поверхности клетки. Рецепторы же стероидных гормонов и гормонов щитовидной железы локализованы исходно преимущественно в цитоплазме и ядре клеток и опосредуют эффекты гормона внутри клетки.

Поскольку комплексирование гормона с рецепторными белками представляет собой пусковую стадию в реализации гормонального эффекта, изучение взаимоотношений рецептора и гормона имеет, вероятно, решающее значение для понимания путей и механизмов действия гормона на клетку и природы чувствительности тканей к гормонам в норме и патологии. Вместе с тем разработка вопросов рецепции гормонов выходит за рамки эндокринологических проблем: эти вопросы являются частью общебиологической проблемы молекулярных основ узнавания — специфического взаимодействия различных биологических структур. Очевидно, все эти обстоятельства обусловливают широкий и все возрастающий интерес, проявляемый исследователями к различным аспектам гормон-рецепторного взаимодействия, и колоссальный поток работ в данной области. Следует отметить также, что экспериментальная разработка проблемы наталкивается на целый ряд принципиальных методических и теоретических трудностей, которые необходимо учитывать и, если удается, преодолевать. Эти трудности обусловлены, в частности, множественностью

и разнообразием гормональных воздействий на клетку, чрезвычайно низкой концентрацией рецепторных белков, их значительной лабильностью, гетерогенностью и сложностью функционально-структурной организации; к ним относятся также наличие в клетке белковых компонентов, неспецифически связывающих гормоны, во многих случаях неполнота знаний о природе и свойствах мест, акцептирующих гормон-рецепторные комплексы, и т. д. Упомянутые трудности, к сожалению, далеко не всегда учитываются и трезво оцениваются многими экспериментаторами, и поэтому в потоке литературы, посвященной рецепции гормонов, довольно часто встречаются случайные, необоснованные, малоубедительные и даже ошибочные данные. Выявить их бывает далеко не просто.

В связи со сказанным на современном этапе нам представляются чрезвычайно важными тщательный анализ, систематизация и рациональное обобщение многочисленных результатов, методических подходов и направлений в данной области биохимии гормонов. Поэтому предлагаемая советским читателям монография весьма полезна и своевременна.

Эта монография представляет собой капитальный труд по молекулярным механизмам гормон-рецепторного взаимодействия, созданный крупными специалистами в соответствующих разделах эндокринологии. Книга состоит из восемнадцати глав, по существу восемнадцати отдельных статей, посвященных изучению клеточной рецепции различных белковых и пептидных, стероидных гормонов и гормонов щитовидной железы, а также катехоламинов и ацетилхолина. Почти в каждой из глав обстоятельно рассмотрены собственные результаты авторов и литературные данные, касающиеся методов определения и идентификации соответствующих рецепторов, их количественной оценки, клеточной локализации, физико-химических характеристик, факторов сопряжения связывания гормона и его специфического эффекта, а также различных физиологических и клинических аспектов обсуждаемого вопроса. Таким образом, в книге достаточно полно, на самом современном и высокопрофессиональном уровне, с различных сторон охвачен круг основных вопросов, связанных с рецепцией гормонов и нейромедиаторов. Содержание книги позволит читателю объективно оценить не только итоги и достижения работ, проводимых в рассматриваемой области, но и, что не менее важно, методические трудности и перспективы предстоящих поисков.

По-видимому, данная монография является в настоящее время наиболее значительным обобщением исследований по проблеме гормон-рецепторного взаимодействия. Приводимые в ней сведения не могут не вызвать интереса со стороны как широкого круга эндокринологов, так и специалистов в области физиологии, биохимии, молекулярной биологии и онкологии.

Вполне естественно, что книга не могла охватить все без исключения аспекты и тенденции проблемы. Дополнительные све-

дения по взаимодействию гормонов с рецепторами читатели смогут найти, в частности, в ряде следующих работ советских и зарубежных авторов последних лет: Биохимия гормонов и гормональной регуляции (Под ред. Н. А. Юдаева). — М.: Наука, 1976; Протасова Т. Н. Гормональная регуляция активности ферментов. М.: Медицина, 1975; Розен В.Б. Некоторые актуальные аспекты динамики стероидных гормонов. — В кн.: Итоги науки и техники. Физиология человека и животных. М: ВИНИТИ, 1973, с. 49—107; Mainwaring W., The Mechanism of Action of Androgens, N. Y. Heidelberg-Berlin, 1977. [Имеется перевод: Мейнуоринг. У. Механизмы действия андрогенов. — М.: Мир, 1979.]; Bradshaw A., Frazier A., et al. (eds.), Surface Membrane Receptors. Interface between Cells and their Environment, N. Y., 1976; Yamamoto K., Alberts B., Steroid Receptors: Elements for Modulation of Eucariotic transcription, in: Annual Review of Biochemistry, 1976, v. 45, p. 721—746; Agarwal M. (ed.), Multiple Molecular Forms of Steroid Hormone Receptors, Amsterdam, 1977.

*В. Б. Розен*

## ПРЕДИСЛОВИЕ

За последние годы наши представления о рецепторах гормонов значительно расширились и углубились. Исторически сложилось так, что понятие «рецептор» плохо поддавалось интерпретации с точки зрения фармакологии. В сообщениях настоящего сборника, посвященных самым разным гормонам, под рецепторами понимаются химические структуры соответствующих тканей-мишеней, содержащие высокоспецифические места для связывания гормональных соединений; результатом такого связывания является инициация рецепторами последующих биохимических реакций, необходимых для осуществления конечного эффекта данного гормона. В этой книге затронуты три больших класса гормонов: полипептидные, стероидные и производные тирозина. Рецепторы полипептидных гормонов, таких, как глюкагон, инсулин, гормон роста, а также рецепторы небольших пептидных гормонов, например рилизинг-факторов гипоталамуса, расположены на наружной поверхности клетки, на плазматической мембране. Для рецепторов же стероидных гормонов, таких, как эстрогены, прогестерон и кортизол, характерна, напротив, внутриклеточная локализация — в цитоплазме или ядре. Гормональные производные тирозина имеют рецепторы обоих типов: рецепторы катехоламинов находятся на плазматической мембране, а рецепторы гормонов щитовидной железы — в ядре. Гормональные соединения двух других классов — простагландины, являющиеся производными жирных кислот, и ацетилхолин — взаимодействуют, по-видимому, со связывающими местами, расположенными на поверхности клеток. Анализ результатов исследований позволяет выявить, как показал Куатреказас (P. Cuatrecasas, Adv. Cyclic Nucl. Res. 5: 79 (1975)), ряд общих для всех рецепторов признаков, независимо от клеточной локализации. Первое: взаимодействие гормона с рецептором должно отвечать требованиям определенной пространственной и структурной специфичности. Второе: количество связывающих мест должно быть ограниченным, и, следовательно, связывающие места должны быть насыщаемыми. Третье: связывание гормона должно иметь тканевую специфичность, соответствующую его биологической специфичности. Четвертое: связывающие места должны обладать высоким сродством к гормону, а их концентрация должна соответствовать физиоло-

гической концентрации гормона. Пятое: связывание гормона рецептором должно быть обратимым. На основе этих принципов мы можем рационально подойти к рассмотрению физиологического значения и практического применения взаимодействия гормонов с рецепторами.

Статьи, вошедшие в настоящий сборник, охватывают широкий спектр современных исследований в области рецепторов гормонов; они написаны ведущими в данной области учеными и отражают современный уровень наших знаний в целом. Мы надеемся, что предлагаемая книга поможет читателю впоследствии самостоятельно разбираться в этой быстро развивающейся и чрезвычайно важной области молекулярной биологии. Если бы такая цель была достигнута, то усилия авторов книги были бы не напрасными.

*Джеральд С. Леви*

## Глава 1

# РЕЦЕПТОРЫ ИНСУЛИНА ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ ОРГАНИЗМА

*Р. КАН И ДЖ. РОТ*

Diabetes Branch
National Institute of Arthritis,
Metabolism and Digestive Diseases
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland

## I. ВВЕДЕНИЕ

С помощью точных методов определения концентрации инсулина в плазме [1] удалось показать, что в ряде случаев содержание этого гормона в крови не точно отражает физиологическое состояние животного. Так, при некоторых заболеваниях, например ожирении, акромегалии и синдроме Кушинга, концентрация инсулина в плазме крови повышена, несмотря на нормальный или повышенный уровень глюкозы. Это позволяет предполагать, что глюкоза в периферической крови устойчива к действию инсулина. Показано также, что по сравнению с нормальными животными концентрация глюкозы в крови этих животных снижается в ответ на введение инсулина более медленно и менее значительно. Вместе с тем после гипофизэктомии и адреналэктомии, по-видимому, возникает повышенная чувствительность к низким концентрациям инсулина в крови и быстрый ответ на введение гормона. Хотя подобные состояния «устойчивости» и «гиперчувствительности» к инсулину описаны достаточно полно, обусловливающие их патофизиологические механизмы в большинстве случаев остаются мало понятными. Новое направление в изучении упоминавшихся выше заболеваний представляют собой исследования, связанные с получением количественных характеристик непосредственного взаимодействия инсулина с его мембранным рецептором. Эти исследования показали, что рецептор не является статической структурой — под действием метаболических, гормональных и, возможно, некоторых других факторов он может изменяться. Рассмотрение природы рецептора инсулина и его взаимодействия с гормоном при различных патологических состояниях и составляет цель данной главы. Но прежде всего необходимо кратко обсудить основные свойства рецептора.

## II. ИСТОРИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Многочисленные прямые и косвенные данные, накопленные за последние 25 лет, свидетельствуют о том, что первой стадией в действии инсулина на клетку, так же как и в случае других полипептидных гормонов, является связывание гормона со специфическими рецепторными участками клеточных плазматических мембран.

Еще в 1949 г. Левин и его сотрудники [2] предположили, что первичное действие инсулина осуществляется на плазматической мембране, поскольку инсулин стимулирует транспорт глюкозы через плазматические мембраны. В том же году Стэди и др. [3] сообщили, что после кратковременной инкубации диафрагмы крыс с инсулином и последующего отмывания ткани обнаруживается стойкое действие инсулина на синтез гликогена. Это стойкое гормональное воздействие могло быть обусловлено либо устойчивой фиксацией гормона в ткани или на ее поверхности, либо инициацией вторичных реакций, последующее протекание которых не зависит от присутствия гормона. Лишь в 1966 г. Пастэн и др. [4] показали, что действие инсулина обусловлено устойчивым состоянием гормона на поверхности клетки, так как после отмывания ткани раствором, содержащим антитела к инсулину, действие последнего уже не обнаруживается.

К подобному заключению пришел и Коно [5], показавший, что обработка трипсином интактных жировых клеток приводит к потере их способности отвечать на введение инсулина; при этом клетки остаются целыми, сама система транспорта глюкозы не изменяется и чувствительность клеток к другим гормонам не снижается. Эти данные позволили предположить, что трипсин разрушает на поверхности клетки какой-то пептидный компонент,—вероятно, рецептор, необходимый для действия инсулина.

Шиммер и др. [6] в отношении адренокортикотропного гормона (АКТГ) и Куатреказас [7] в отношении инсулина предложили новый косвенный подход для подтверждения мембранной локализации первичного действия этих гормонов. Они показали, что гормон, будучи ковалентно связан с высокомолекулярным инертным полимером, например целлюлозой или сефарозой, способен в таком состоянии проявлять биологическую активность. На основании этого наблюдения был сделан вывод о том, что гормон может оказывать биологическое действие, не проникая в клетку. Однако в дальнейшем было обнаружено, что связанный с сефарозой инсулин может освобождаться из комплексов в процессе инкубации [8], а поэтому интерпретация и обоснованность данных, полученных в более ранних экспериментах [9, 10], остаются сомнительными.

Прямые эксперименты по изучению взаимодействия инсулина с рецептором были предприняты еще в 1952 г. [11]. Однако эти

исследования осложнялись следующими трудностями: небольшим количеством связанного инсулина [12], необходимостью определения биологической активности меченого гормона [13] и особенно тем, что отсутствовали данные в отношении биологического значения и специфичности процесса связывания [14]. В 1969 г. благодаря двум новым методам в изучении гормон-рецепторных взаимодействий открылись новые горизонты. Мы имеем в виду получение препаратов гормонов с высокой удельной радиоактивностью, у которых сохранены их биологические свойства [15, 16], а также применение аналогов гормонов при определении специфичности действия последних [15, 17]. Сейчас эти методы широко используются для изучения механизма действия целого ряда гормонов в различных тканях-мишенях (для подробного ознакомления см. [18] и [19]).

## III. СВОЙСТВА РЕЦЕПТОРА ИНСУЛИНА

Рецепторы инсулина обнаружены сейчас во многих препаратах из тканей различных видов животных (табл. 1) [20] и некоторые из них подробно изучены [21—38]. Поскольку рецептор инсулина не выделен в чистом виде, в каждом случае необходимо охарактеризовать его с помощью таких параметров связывания, как высокое сродство к инсулину, быстрое и обратимое связывание с последним и насыщаемость такого связывания. Сущность же функ-

*Таблица 1*

**Ткани и биологические виды, для которых прямыми способами показано наличие рецепторов инсулина [18—20, 38].**

| Виды | Ткани |
|---|---|
| Человек | Печень |
| Обезьяна | Жировая ткань |
| Крыса | Скелетная мышца |
| Мышь | Миокард |
| Морская свинка | Легкое |
| Кролик | Почки |
| Овца | Мозг |
| Голубь | Надпочечники |
| Индюк | Молочная железа |
| Лягушка | Яичники |
| | Семенники |
| | Матка |
| | Плацента |
| | Селезенка |
| | Моноциты крови |
| | Лимфоциты тимуса |
| | Ядерные эритроциты |
| | Фибробласты |

ционального определения рецептора заключается в гормональной и биологической специфичности последнего. Важно подчеркнуть, что рецептор определенного типа связывается с гормоном только вполне определенного типа, и это связывание может коррелировать с биологической активностью гормона. В отношении рецептора инсулина это означает, что все другие соединения, не являю-

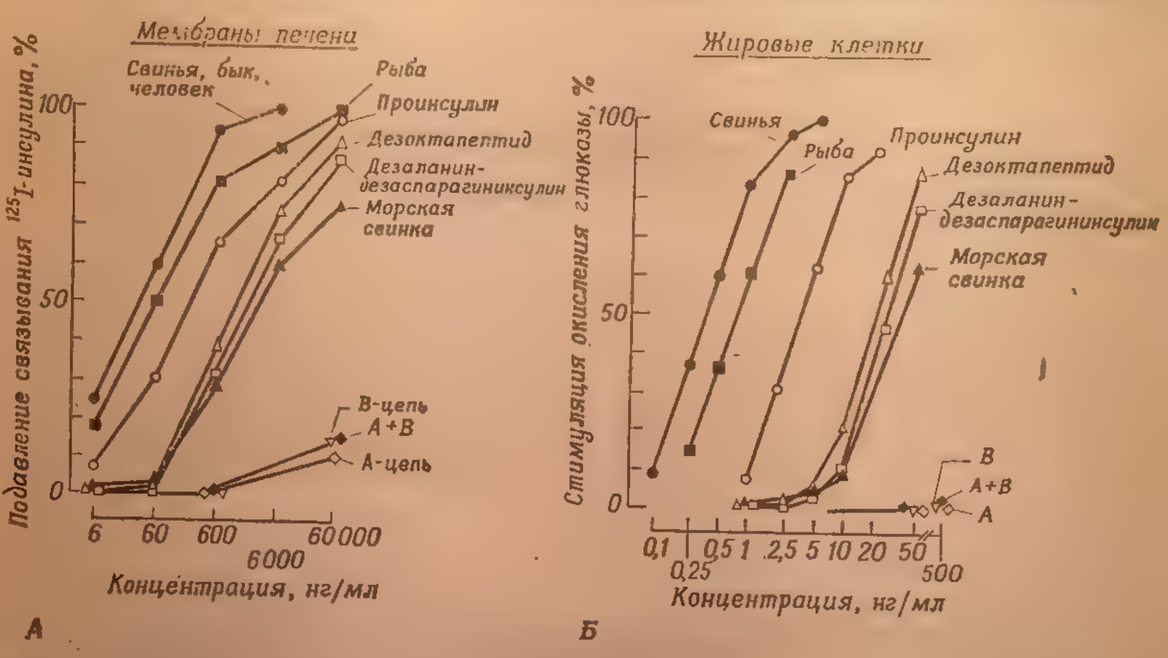



**Рис. 1.** Действие инсулина и его аналогов на связывание $^{125}$I-инсулина мембранами печени и на окисление глюкозы в жировых клетках. *А*. Угнетение связывания $^{125}$I-инсулина (свиного) мембранами печени, выраженное в процентах от максимального, откладывается как функция концентрации немеченого пептида. *Б*. Стимуляция окисления глюкозы в изолированных жировых клетках, выраженная в процентах от максимальной, откладывается как функция концентрации немеченого пептида [21].

щиеся близкородственными инсулину, не конкурируют за рецепторные места, а относительная способность ряда аналогов гормона конкурировать за связывающие места прямо пропорциональна их биологической активности (рис. 1) [21, 23, 26, 38—40]. В отличие от этого специфичность, проявляемая связывающими местами антител, обычно не коррелирует с их биологической активностью [21]. Более того, указанное свойство, по-видимому, является характерной особенностью рецепторов, поскольку, как показано во всех изученных до сих пор тканях различных видов животных, рецепторы инсулина обладают одинаковой специфичностью связывания [38, 41].

Куатрекасас и Холленберг [42] считают, что указанные выше критерии специфичности рецепторного связывания не достоверны, поскольку при взаимодействии с инсулином таких нерецепторных материалов, как, например, силикаты, также можно обнаружить

насыщаемость, специфичность, высокое сродство и обратимость связывания. Вместе с тем хотя взаимодействие инсулина с «нерецептором» при поверхностном рассмотрении, по-видимому, и удовлетворяет названным критериям, однако при более тщательном анализе различия между связыванием с рецептором и нерецептором становятся очевидными. Так, для вытеснения $^{125}$I-инсулина,

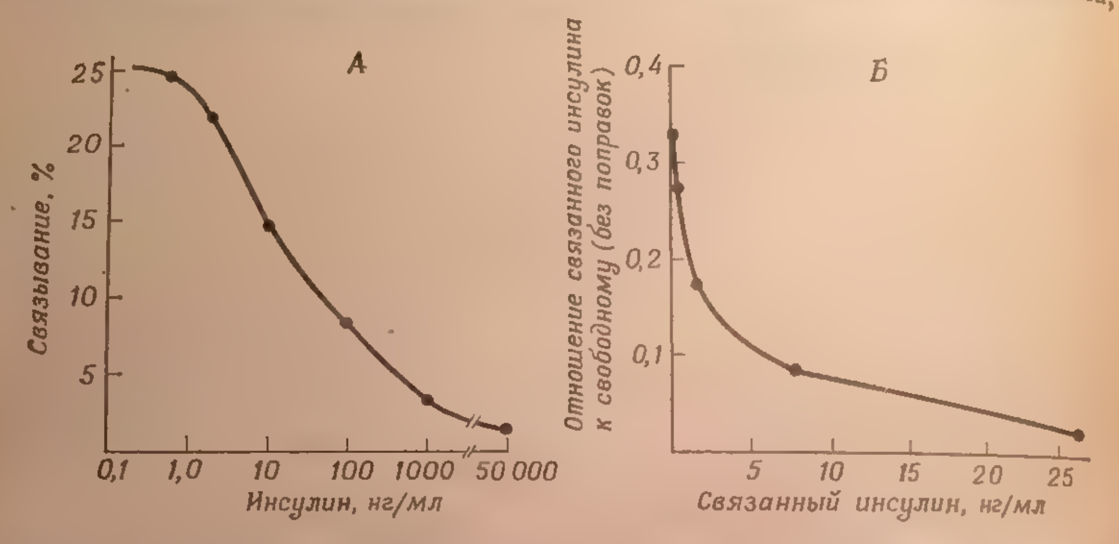



**Рис. 2.** Связывание $^{125}$I-инсулина с плазматическими мембранами печени. *А.* Мембраны печени (0,6 мг/мл) инкубировали с $^{125}$I-инсулином (100 пМ) при 30° С в течение 60 мин. По оси ординат — $^{125}$I-инсулин, связанный с мембранами печени (в процентах), по оси абсцисс — общая концентрация инсулина. *Б.* График Скэтчарда, построенный по данным, приведенным в *А* [25].

связанного с тальком, требуется в 100 раз больше немеченого гормона, чем для вытеснения его из комплексов с рецепторами цитоплазматических мембран печени. Кроме того, при связывании инсулина с тальком не обнаруживается никакой биологической специфичности [42]: связывание заметно ингибируется в присутствии проинсулина и дезоктапептида инсулина (биологическая активность, которых по отношению к нативному гормону составляет соответственно 5 и 1%), а также в присутствии пептида 1-39 гормона роста и карбоксиметилированного инсулина — соединений, не обладающих инсулиноподобной активностью.

Количественные аспекты взаимодействия рецептора с инсулином очень сложны и изучены еще недостаточно [25]. Среди исследователей, изучавших эту проблему, лишь Куатреказас и его сотрудники [30, 31, 43] сообщили об обнаружении только одного класса связывающих мест с высоким сродством к гормону ($K \approx 10^{10}$ $M^{-1}$) как в печени, так и в жировой ткани. Другие исследователи, используя различные ткани, в том числе и выше названные, отмечали низкое сродство связывающих мест [28, 29, 32] и часто получали нелинейные графики Скэтчарда [24, 25, 34—

36, 38]. Это дало возможность авторам сделать предположение о гетерогенности связывающих мест или о наличии отрицательного кооперативного эффекта (рис. 2). За последнее время Де Мейтс и др. [44] внесли некоторую ясность в этот вопрос, показав, что рецепторные связывающие места инсулина ведут себя не независимо друг от друга (необходимое допущение для простого бимолекулярного равновесного анализа) [45], а скорее всего взаимодействуют между собой по типу отрицательной кооперативности. Это означает, что связывание гормона с рецептором снижает сродство других рецепторов (и, возможно, самого связанного рецептора) к гормону. Таким образом, кажущееся сродство рецептора к гормону уменьшается по мере увеличения количества занятых рецепторов. Это было доказано экспериментально, поскольку скорость освобождения меченого гормона из его комплекса с рецептором после того, как другие рецепторы окажутся занятыми немеченым гормоном, увеличивается. Эта особенность наряду с биологической специфичностью, по-видимому, является основополагающим свойством рецепторов инсулина и, как сейчас установлено, присуща рецепторам инсулина в разных тканях различных видов животных [38, 41, 44, 46]. Кроме того, благодаря указанной особенности мы имеем чувствительный критерий для измерения числа занятых рецепторов (занятость лишь 5—10% рецепторов вызывает значительное увеличение скорости диссоциации), который нашел применение в изучении популяций рецепторов при различных патологических состояниях организма (разд. VII, А).

## IV. ДЕГРАДАЦИЯ ГОРМОНА И РЕЦЕПТОРА

Для правильной количественной оценки взаимодействия инсулина с его рецептором следует учитывать два дополнительных фактора, которые могут оказывать влияние на это взаимодействие при патологических состояниях: деградацию гормона и деградацию рецептора. Деградация инсулина (рис. 3) — это процесс, протекающий, по-видимому, обособленно от связывания гормона с рецептором, причем оптимумы pH, ионной силы и температуры, а также специфичность этих процессов у разных аналогов инсулина [22, 23] существенно различаются. В точных сравнительных исследованиях важно установить степень деградации гормона, так как ее увеличение может привести к уменьшению количества интактного инсулина, доступного для связывания с рецептором, и, таким образом, к кажущемуся уменьшению содержания рецепторов инсулина.

Деградация рецептора — менее изученная реакция, чем деградация гормона [25, 36, 47]. Подобно деградации гормона эта реакция зависит от времени, температуры, ионной силы и концентрации мембран (рис. 4). В условиях высокой ионной силы пе-

риод полужизни рецептора инсулина может укорачиваться до 30 мин [25]. Химический механизм деградации пока еще не установлен, но по крайней мере в одном случае он, по-видимому, связан с освобождением рецепторов в инкубационную среду [47].

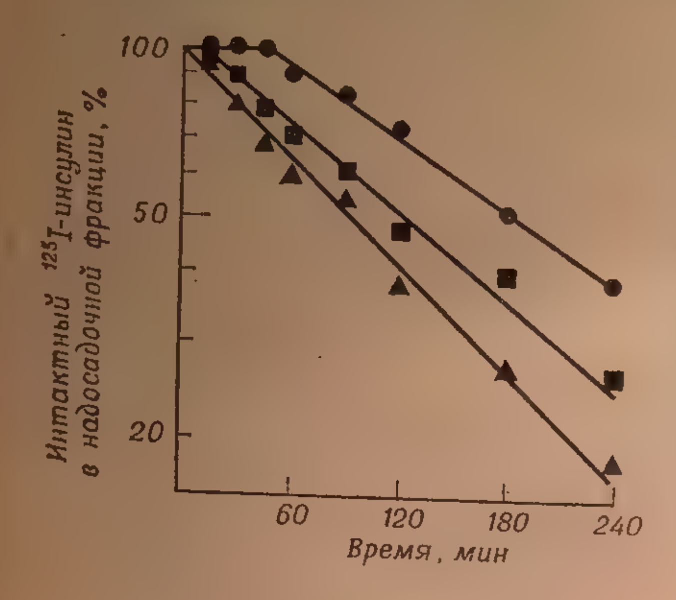



**Рис. 3.** Деградация инсулина в препаратах мембран различной концентрации. $^{125}$I-инсулин (20 пМ) инкубировали с мембранами печени при 30° С в присутствии 60 мМ Na+. Мембраны взяты в концентрации 0,2 (●), 0,4 (■), 0,8 (▲) мг/мл. Аликвоты недосадочной фракции инкубационной среды отбирали через указанные промежутки времени, и интактный $^{125}$I-инсулин измеряли по его способности вновь связываться со свежей аликвотой мембран [25].

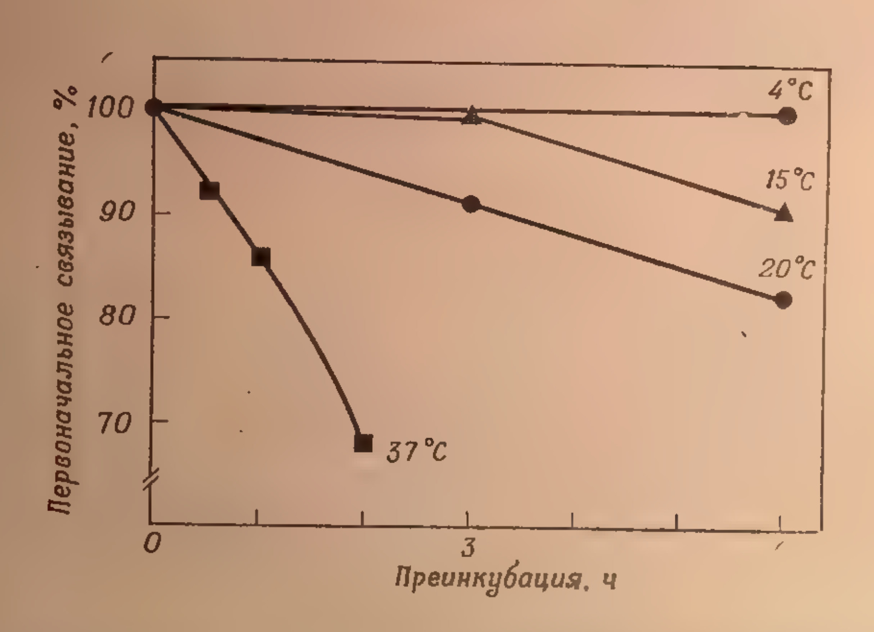



**Рис. 4.** Деградация рецептора инсулина в мембранах печени мыши как функция температуры. Мембраны печени нормальных мышей (0,28 мг/мл) инкубировали в микроцентрифужных пробирках Beckman при 4, 15, 20 и 37° С в течение указанного времени. Затем пробы уравновешивали при 15° С в водяной бане и добавляли $^{125}$I-инсулин до конечной концентрации 20 пМ. Во второй серии опытов для измерения неспецифического связывания добавляли также немеченый инсулин (50 мкг/мл). После инкубации при 15° С в течение 3 ч пробы центрифугировали и просчитывали радиоактивность осадка. Специфическое связывание $^{125}$I-инсулина выражали в процентах от связывания, наблюдаемого без предварительной инкубации [46].

## V. ПРЕПАРАТЫ РЕЦЕПТОРОВ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение взаимодействия инсулина с рецептором проводилось на различных препаратах рецепторов, включая интактные клетки, отдельные фракции клеток и солюбилизированные фракции клеток [18]. Следует подчеркнуть, что все эти препараты являются до некоторой степени гетерогенными. Поэтому для правильной оценки роли специфических мембранных рецепторов при патологических состояниях важно как можно точнее определять концентрацию плазматических мембран или клеток, содержащих рецепторы.

Трудности количественного определения рецепторов, как правило, возрастают, когда приходится иметь дело с препаратами мембран. Происходит это по следующим трем причинам: во-первых, рецепторы гормона могут присутствовать во фракциях неплазматических мембран клетки [48—50]; во-вторых, белки плазматических мембран обычно составляют всего 1—5% общего количества белка в клетке [51]; в-третьих, большинство методов, используемых для выделения мембран, позволяет получать мембраны с выходом менее 25% [51, 52]. Кроме того, мембраны, выделяемые из определенного органа, как правило, содержат примеси мембран из клеток других органов. Данная проблема еще больше усложняется при сравнении мембран нормальной ткани и ткани, измененной при каком-либо патологическом состоянии организма. Из-за неоднородности исходного материала нельзя считать, что получаемые с помощью упомянутых методов препараты мембран всегда будут одинаковыми. Поэтому следует уделять особое внимание количественному определению выхода и чистоты препарата мембран. Для более подробной информации по этим вопросам мы отсылаем читателя к соответствующим работам [51, 52].

Аналогичные проблемы возникают и при изучении связывания в интактных клетках, поскольку их часто выделяют из смешанных популяций. В качестве примера можно привести связывание инсулина с лейкоцитами человека. Исследования, проведенные в нашей лаборатории [53, 54], показали, что мононуклеарные лейкоциты, выделенные из периферической крови нормальных доноров и очищенные с помощью центрифугирования в градиенте фиколл-хипак, содержат рецепторы инсулина. Мононуклеарные клетки, полученные таким методом, представляют собой неоднородную клеточную популяцию, в состав которой входит приблизительно 68% Т-лимфоцитов, 9% В-лимфоцитов и 22% моноцитов [55, 56]. Было высказано предположение о том, что инсулин связывается с рецептором на поверхности лимфоцитов, поскольку последние составляют бо́льшую часть клеток данной популяции и в перевиваемой культуре лифобластоидных клеток обнаруживаются рецепторы в высокой концентрации [26, 27]. Это наблюдение получило подтверждение и в ряде других лабораторий [57, 58]. Вместе с тем Крагу и др.

[59] не удалось обнаружить достоверного связывания инсулина с лимфоцитами периферической крови, очищенными путем пропускания исходного материала через плотно упакованную нейлоновую вату. При такой обработке, как известно, удаляются В-лимфоциты; поэтому Олефски и Ривн [57] предположили, что инсулин-

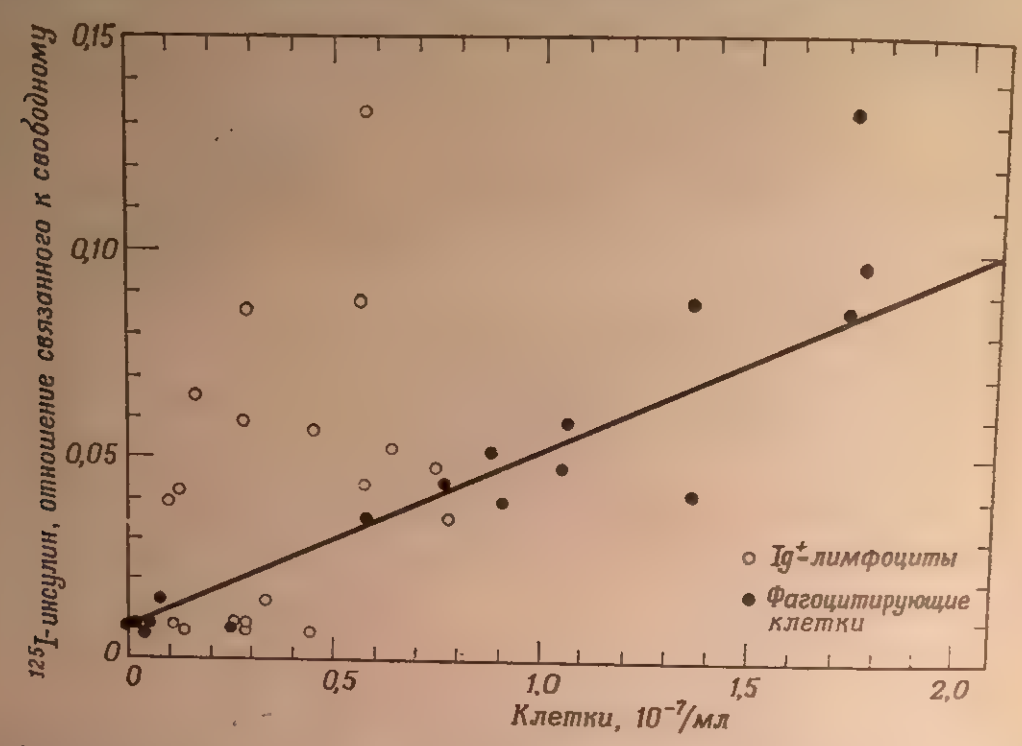



**Рис. 5.** Корреляция между количеством связанного инсулина и числом В-лимфоцитов или моноцитов в смеси мононуклеарных клеток. Мононуклеарные лейкоциты, полученные из форменных элементов периферической крови человека с помощью фиколл-хипакового градиентного разделения, обогащали или истощали моноцитами (фагоцитирующие клетки), пропуская смесь через колонки со стеклянной ватой или сефадексом G-10. Затем определяли специфическое связывание инсулина в смешанных популяциях клеток, инкубируя их с $^{125}$I-инсулином (0,1—0,5 нг/мл) в течение 3 ч при 22° С в присутствии или в отсутствие избытка немеченого инсулина. Число моноцитов (фагоцитирующие клетки) подсчитывали по поглощению частиц латекса, а В-лимфоцитов — с помощью метода флуоресцирующих антител к иммуноглобулинам (Ig$^{+}$-лимфоциты). Связывание инсулина коррелировало с числом моноцитов ($r=0,857$, $p<0,001$), но не с числом В-лимфоцитов [56].

связывающими клетками являются В-лимфоциты. Позднее совместно со Шварцем [56] мы изучали связывание инсулина с препаратами мононуклеарных лейкоцитов до и после избирательного удаления или обогащения популяции моноцитами путем пропускания суспензии клеток через колонки, наполненные стекловатой или сефадексом G-10. В наших экспериментах было показано, что количество $^{125}$I-инсулина, специфически связанного неоднородной популяцией клеток, хорошо коррелирует с количеством моноцитов, но не В- или Т-лимфоцитов (рис. 5). Эти результаты были также подтверждены с помощью радиоавтограмм, на которых можно

непосредственно наблюдать $^{125}$I-инсулин, связанный с моноцитами. Таким образом, в каждом случае при изучении смешанной клеточной популяции для обнаружения изменений в концентрации рецепторов инсулина у человека важно достаточно точно определить число моноцитов в препарате, и это позволит правильно интерпретировать данные о связывании гормона. Результаты этих исследований четко указывают на ошибочность предположения о том, что в смешанной популяции ответственными за данную биологическую функцию неизбежно являются клетки преобладающего типа.

## VI. КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ СВЯЗЫВАНИЕМ И БИОЛОГИЧЕСКИМ ЭФФЕКТОМ

Уже неоднократно предпринимались попытки установить количественные соотношения между связыванием инсулина с рецепторами и биологическим действием инсулина, исходя из моделей действия этого гормона, основанных либо на «теории занятости», либо на «теории скорости». Результаты кинетических исследований, проведенных Глиманном и сотр. [33], позволили выявить четкую корреляцию между скоростью связывания инсулина и стимулирующим действием этого гормона на липогенез в жировых клетках, несмотря на тот факт, что для максимального биологического эффекта необходима занятость гормоном лишь небольшой части рецепторов. В большинстве случаев при изучении равновесного состояния было также показано, что, хотя ответ тканей-мишеней прямо пропорционален количеству занятых рецепторных мест, максимальный ответ достигается при насыщении только меньшей части рецепторов, т. е. существуют «запасные», или «резервные» рецепторы. Например, максимальная стимуляция инсулином окисления глюкозы или липогенеза в жировой ткани наблюдается в равновесных условиях при занятости приблизительно лишь 2% рецепторов клетки [28, 29, 32].

Некоторые исследователи считают «резервные» рецепторы неактивными или физиологически незначимыми, полагая тем самым, что связывание гормона с рецептором и стимуляция биологического действия должны быть строго количественно сопряжены почти при любых, если не при всех без исключения, концентрациях гормона [60, 61]. На основе такой предпосылки можно себе представить лишь в высшей степени «жесткую» модель механизма действия гормона, которая не нашла подтверждения при изучении взаимодействия инсулина [28, 29, 32], глюкагона [62], гонадотропинов [63], тиреотропного гормона (ТТГ) [64] или АКТГ [65] с соответствующими рецепторами. В каждом случае была выявлена нелинейная корреляция между связыванием гормона и его максимальным биологическим эффектом, что обычно наблюдается только при частичной занятости рецепторов. В отношении рецептора

инсулина положение осложняется еще и тем, что не все биологические воздействия этого гормона, даже в одной ткани, максимально выражены при одной и той же концентрации гормона [28]. Поэтому соотнести кривую связывания с кривыми биологических ответов можно не при любой используемой концентрации гормона. Более того, возможно, в генерировании биологического ответа на инсулин [66, 67] и в инсулин-рецепторных взаимодействиях [44] участвуют кооперативные и аллостерические механизмы. Таким образом, исходя из имеющихся данных, нет оснований считать одни рецепторы «активными», а другие — «неактивными»; становится все более очевидным, что механизм действия инсулина достаточно сложен, и вряд ли можно подогнать эти данные к предлагаемым упрощенным моделям.

Каков бы ни был точный механизм сопряжения, связывания инсулина и его биологического действия, наблюдаемый биологический эффект должен быть функцией концентрации гормон-рецепторного комплекса [ГРц] или

$$\text{Биологический эффект} = \text{Функция}\,[\text{ГРц}]. \qquad (1)$$

Если мы представим взаимодействие гормона [Г] с рецептором [Рц] как

$$\text{Г} + \text{Рц} \rightleftarrows \text{ГРц}, \qquad (2)$$

то

$$K = \frac{[\text{ГРц}]}{[\text{Г}]\,[\text{Рц}]} \qquad (3)$$

и

$$[\text{ГРц}] = K\,[\text{Г}]\,[\text{Рц}] \qquad (4)$$

или, подставляя уравнение (4) в уравнение (1), имеем

$$\text{Биологический эффект} = \text{Функция}\,(K\,[\text{Г}]\,[\text{Рц}]). \qquad (5)$$

Это означает, что биологический эффект является функцией концентраций свободного гормона, свободного рецептора и сродства ($K$) гормона к рецептору. При наличии какого-то числа запасных рецепторов биологический эффект будет изменяться прямо пропорционально концентрации гормона (4) только до такой концентрации, при которой концентрация комплекса [ГРц] достаточна для максимального биологического эффекта. При концентрациях гормона ниже [$\text{Г}_{\text{макс}}$] биологический эффект будет изменяться прямо пропорционально изменениям $K$ или [Рц], несмотря на то, что некоторые рецепторы остаются «запасными». При наличии достаточного числа рецепторов для достижения концентрации комплекса [ГРц], необходимой для максимального биологического эффекта, [$\text{Г}_{\text{макс}}$] должна меняться обратно пропорционально изменениям $K$ или [Рц].

Предположим, что для получения полумаксимального биологического ответа в клетке, имеющей, например, 10 000 инсулиновых рецепторов, необходима занятость лишь 100 рецепторов, и это осуществляется при концентрации инсулина $10^{-10}$ М. Если же в результате заболевания число рецепторов на клетку уменьшается до 1000, то занятость 100 рецепторов и полумаксимальный биологический ответ теперь должны наблюдаться уже при концентрации инсулина $10^{-9}$ М, несмотря на то, что в этом случае окажется занятой относительно бóльшая часть рецепторов. Подобные же изменения зависимости биологического ответа от дозы гормона могут быть следствием и изменений в сродстве гормона к рецептору. Таким образом, клетка способна изменять свою чувствительность к инсулину посредством изменения концентрации рецептора, сродства рецептора, а также любых реакций, протекающих после связывания гормона с рецептором и необходимых для формирования биологического ответа, либо за счет одновременного изменения всех этих факторов. В ряде случаев последствия изменения числа рецепторов или сродства гормона могут быть сбалансированы изменениями, происходящими на стадиях, следующих за связыванием гормона. Очевидно, изменение в связывании инсулина не всегда сопровождается изменением биологической чувствительности к инсулину, и наоборот.

Наконец, необходимо подчеркнуть, что пока еще не ясно, как правильнее выражать изменения концентрации рецептора, поскольку не известно, чем обусловлена чувствительность клетки: общим количеством рецепторов на клетку или их числом на единицу поверхности клетки. Результаты предварительных электронно-микроскопических исследований позволяют предположить, что рецепторы к инсулину в печеночных и жировых клетках склонны к образованию кластеров [68, 69]. Левитски [66] полагает, что способность гормональных рецепторов объединяться в кластеры имеет чрезвычайно важное значение для биологического эффекта гормона. Следовательно, более правильно выражать концентрацию рецептора в клетке числом рецепторов на единицу площади поверхности клетки, а не на клетку в целом. Если это действительно так, то большая клетка может быть менее чувствительной к инсулину, чем маленькая клетка того же типа, даже при условии, что они обе имеют одинаковое число рецепторов на клетку.

## VII. ИЗМЕНЕНИЯ РЕЦЕПТОРОВ ИНСУЛИНА ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

На основании вышеизложенного совершенно очевидно, что инсулиновые рецепторы могут изменяться при различных заболеваниях разными способами, каждый из которых в конечном итоге должен найти отражение в изменении чувствительности различных тканей-мишеней к инсулину. Сродство рецептора к инсулину может снижаться вследствие кооперативных взаимодействий между

субъединицами рецептора или уменьшения числа рецепторов из-за нарушения их синтеза или ускорения деградации. Более того, в каждом случае эти изменения либо обусловлены какими-то первичными изменениями в самом рецепторе, либо возникают вторично в результате изменений в мембране. Нарушения, при которых изучены рецепторы инсулина, указаны в табл. 2 и будут подробно

*Таблица 2*

**Изменения рецепторов инсулина при различных нарушениях**

| Нарушение | Связывание инсулина | Механизм |
|---|---|---|
| Ацидоз | Уменьшенное | Изменение сродства |
| Адреналэктомия | Увеличенное | ? То же |
| Старение | Нормальное или уменьшенное | Уменьшение числа рецепторов |
| Диабет | То же | То же |
| Изменение рациона | | |
| Голодание | Увеличенное | ? Изменение сродства и числа рецепторов |
| Рацион, богатый жирами | Уменьшенное | Уменьшение числа рецепторов |
| Избыток гормона роста | Нормальное | — |
| Избыток глюкокортикоидов | Уменьшенное | ? Изменение сродства или кооперативный эффект |
| Гипофизэктомия | Увеличенное | ? |
| Резистентность к инсулину при акантозе | Уменьшенное | Уменьшение числа рецепторов и сродства; кооперативный эффект |
| Ожирение | » | Уменьшение числа рецепторов |
| Беременность | Увеличенное (?) | ? |

обсуждены ниже. В настоящее время повреждения рецептора достаточно детально охарактеризованы лишь для очень немногих заболеваний.

## А. Ожирение

Наиболее общей формой гормональной устойчивости у людей и животных является связанная с ожирением резистентность к инсулину. Эта форма характеризуется гиперинсулинемией, как базальной, так и стимулируемой, различной степенью отсутствия толерантности к глюкозе и устойчивостью к эндогенному и экзогенному инсулину [70]. Основное повреждение происходит, по-видимому, на уровне клетки-мишени, поскольку концентрации циркулирующих инсулина и проинсулиноподобных веществ сохраняются нормальными [71], а ткани-мишени дают одинаковый ослабленный ответ, когда их сравнивают после введения экзогенного инсулина

или при изучении in vitro [70—72]. По крайней мере частично наблюдаемая при ожирении резистентность к инсулину обусловлена уменьшением числа рецепторов в клетке-мишени.

Наиболее хорошо изученным типом ожирения у животных является ожирение у мышей с гипергликемией, которое представляет собой аутосомный рецессивный признак (ob/ob), характеризующийся гиперфагией, избыточным отложением жира, гипергликеми-

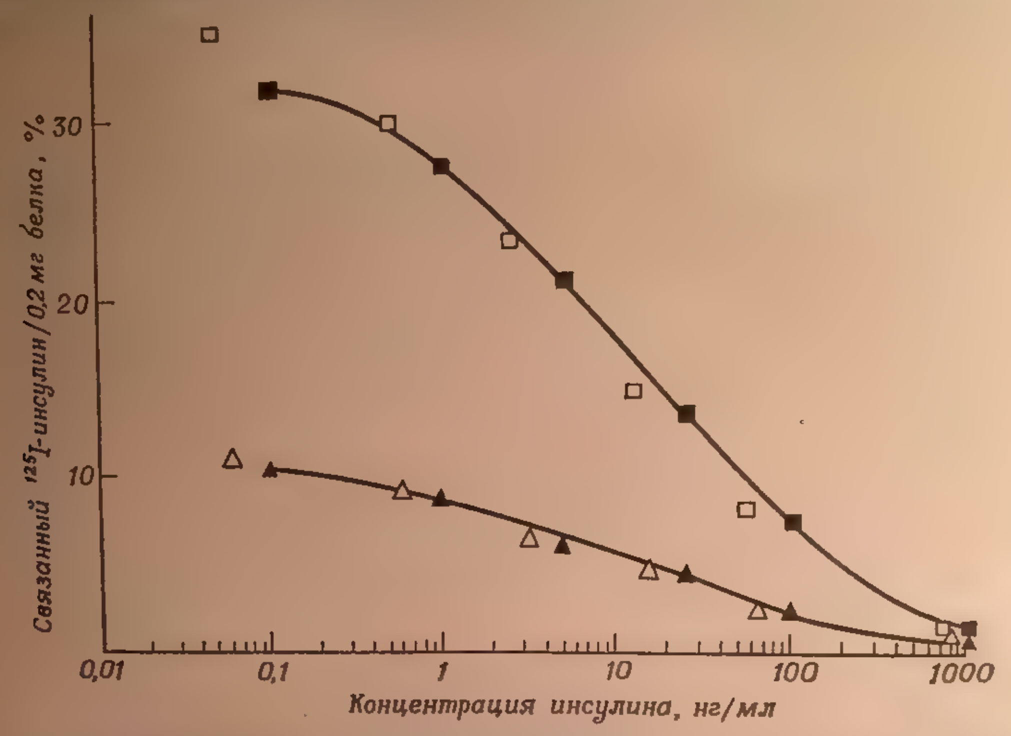



Рис. 6. Связывание инсулина плазматическими мембранами печени худых мышей и мышей с ожирением. Связывание $^{125}$I-инсулина (0,1 нг/мл) очищенными плазматическими мембранами, полученными от мышей ob/ob (треугольники) и худых (квадраты), определяли при 20° С после 6 ч инкубации. Данные выражены в процентах связанного $^{125}$I-инсулина мембранным белком в концентрации 0,2 мг/мл [46].

ей, гиперинсулинемией и гиперплазией клеток в островках поджелудочной железы [72]. Мыши ob/ob обладают значительной устойчивостью как к эндогенному, так и к экзогенному инсулину в условиях in vivo и in vitro. Было обнаружено, что после инкубации в идентичных условиях препаратов мембран, полученных из печени мышей ob/ob и худых мышей, связывание инсулина мембранами мышей с ожирением всегда составляло только 25—35% связывания, наблюдаемого у худых животных [46, 73, 74] (рис. 6). Уменьшение в связывании инсулина присуще не только мембранам клеток печени, но обнаруживается также в аналогичных экспериментах с мембранами адипоцитов [75], клеток миокарда [76] и интактных лимфоцитов тимуса [77].

Отмеченные различия в связывании инсулина, очевидно, обусловлены только уменьшением числа рецепторов. Если отношение

связанный меченый гормон/свободный меченый гормон выражают как функцию связанного гормона (график Скэтчарда), то для худых мышей и для мышей с ожирением получают кривые одинаковой формы (рис. 7). График Скэтчарда этого типа отражает постоянно уменьшающееся сродство популяции инсулиновых рецепторов к гормону по мере того, как доля связанных с гормоном рецепторов увеличивается. Это соответствует эффекту отрицательной

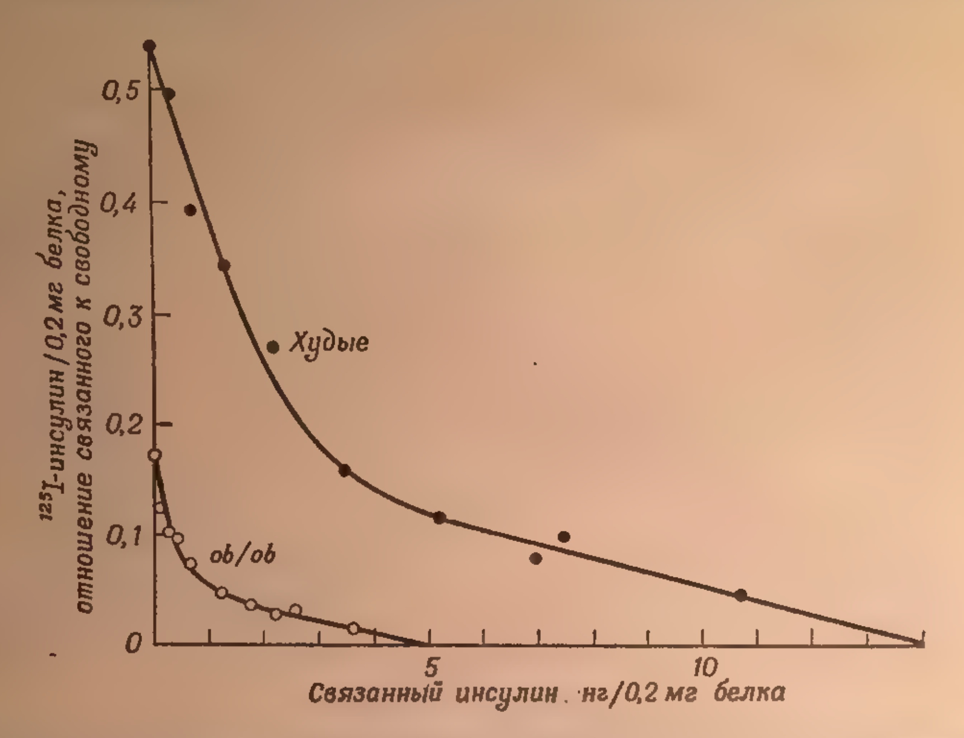



**Рис. 7.** График Скэтчарда связывания инсулина плазматическими мембранами печени худых мышей и мышей с ожирением. Подробности эксперимента см. в подписи к рис. 6. [46].

кооперативности (разд. III). Уменьшение связывания инсулина, наблюдаемое у мышей с ожирением, можно объяснить целиком уменьшением концентрации инсулинового рецептора, о чем свидетельствует точка пересечения кривой Скэтчарда с осью абсцисс при ее экстраполяции. В ряде других исследований было показано [46], что инсулиновые рецепторы мышей ob/ob не отличаются от соответствующих рецепторов нормальных мышей в отношении кинетики ассоциации и диссоциации, кооперативности, температурной зависимости связывания и биологической специфичности.

Как отмечалось выше, обнаружение уменьшения рецепторов в препаратах очищенных мембран еще не является достаточным для заключения о действительном уменьшении числа этих рецепторов в нативной клетке, поскольку при сравнении иногда используют неадекватные препараты мембран из печени мышей с ожирением и нормальных животных. Кроме того, кажущееся уменьшение числа рецепторов может быть обусловлено увеличением в исследуемых

препаратах активности, разрушающей либо инсулин, либо рецептор. С помощью различного рода контрольных экспериментов было установлено, что уменьшение связывания инсулина у мышей ob/ob, по-видимому, является специфическим изменением. Изучаемые препараты мембран оказались идентичными в отношении об-

*Таблица 3*

**Сравнительные характеристики мембран печени мышей ob/ob и худых мышей [1]**

| | Худые | ob/ob |
|---|---|---|
| Выход (мг белка/10 г печени) | 5,3 | 6,9 |
| 5′-нуклеотидаза (мкмоль/мг·ч) | 6,8 | 6,8 |
| Аденилатциклаза (нмоль/мг·10 мин) | | |
| Базальная | 0,55 | 0,44 |
| Стимулируемая глюкагоном | 1,48 | 1,54 |
| Сукцинат — цитохром-*c*-редуктаза [2] (мкмоль/мг·ч) | 0,36 | 0,30 |
| Глюкозо-6-фосфатаза [3] (мкмоль/мг·ч) | 0,54 | 0,42 |
| Связывание $^{125}$I-инсулина [4] (фмоль/мг) | 31,8 | 10,5 |

[1] Данные из работ [52, 73, 74].
[2] Сукцинат — цитохром-*c*-редуктаза служит маркером митохондриальных мембран.
[3] Глюкозо-6-фосфатаза служит маркером микросомных мембран печени.
[4] Связывание $^{125}$I-инсулина при 20° С и концентрации $^{125}$I-инсулина $2 \cdot 10^{-11}$ М.

щей морфологии, активности мембранных ферментов, примесей других органелл и, судя по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) (табл. 3) [73, 74], в отношении субъединичной структуры белков. На основании этих данных мы пришли к заключению, что для отбора препаратов мембран полезно дополнительно измерять в них связывающую активность рецепторов других гормонов. У мышей ob/ob связывание мембранами глюкагона, гормона роста и изопротеренола почти или вообще не уменьшалось по сравнению с нормальными животными [74.]

Не обнаружено также увеличения распада инсулина или рецептора, за счет чего можно было бы объяснить наблюдаемый результат [46]. И наконец, тот же самый характер уменьшения числа инсулиновых рецепторов был установлен при изучении связывания инсулина с изолированными интактными гепатоцитами, хотя по размеру гепатоциты мышей ob/ob немного больше гепатоцитов контрольных мышей [74]. Таким образом, показано, что мыши ob/ob имеют пониженное содержание рецепторов инсулина независимо от того, как его выражать: в расчете числа рецепторов на клетку, на единицу площади поверхности клетки, на единицу аденилатциклазной или 5′-нуклеотидазной активности или на число рецепторов глюкагона, гормона роста и изопротеренола.

Следует отметить способ контроля, который был дополнительно введен во всех вышеупомянутых исследованиях. Поскольку у животных с ожирением отмечается гиперинсулинемия, можно предположить, что уменьшение числа рецепторов при этом является простым отражением занятости рецепторов инсулином в момент выделения ткани. Некоторые данные, однако, не позволяют согласиться с этим предположением. Так, при введении больших доз инсулина худым мышам подкожно или непосредственно в воротную вену концентрация выявляемых рецепторов в препаратах плазматических мембран печени не изменяется [74]. Подобным же образом не меняется концентрация рецепторов инсулина в лимфоцитах тимуса худых мышей, которым внутрибрюшинно вводили инсулин в количестве, достаточном для того, чтобы увеличить концентрацию инсулина в плазме до уровня, наблюдаемого у мышей ob/ob [77]. Явное снижение содержания рецепторов наблюдается в том случае, когда под влиянием очень больших доз инсулина концентрация гормона в плазме у худых мышей увеличивается настолько, что даже превышает его концентрацию у мышей ob/ob, поскольку при промывании мембран не удается удалить весь эндогенно-связанный инсулин.

Дополнительным аргументом против идеи о предварительной занятости рецепторов эндогенным инсулином служат данные кинетических исследований. Поскольку повышение занятости рецепторов приводит к увеличению скорости диссоциации инсулина, логично было бы предположить, что такого увеличения следует ожидать и в экспериментах с плазматическими мембранами клеток животных с ожирением при условии значительной занятости рецепторов эндогенным инсулином. Однако одинаковые скорости диссоциации инсулина из комплекса с рецептором как у мышей с ожирением, так и у худых животных свидетельствуют о том, что доля занятости рецептора чрезвычайно мала [46].

Уменьшение числа рецепторов инсулина не является уникальным свойством рассматриваемого типа ожирения. Мы также обнаружили уменьшение рецепторов инсулина при других генетических формах ожирения мыши (db/db) и при ожирении, к которому приводит введение тиоглюкозы [78—80]. Аналогичные результаты были получены Бакстером и др. [81], которые сообщили об уменьшении содержания рецепторов инсулина в мембранах печени новозеландских (NZO) мышей с ожирением. Пониженное число рецепторов инсулина было обнаружено также в жировой ткани [82] и в мононуклеарных клетках крови тучных людей, обладающих резистентностью к инсулину [53—54]. Уменьшения содержания рецепторов инсулина при ожирении не установлено только в двух исследованиях, причем оба относились к жировой ткани. Ливингстон и др. [83] не обнаружили изменений в связывании инсулина (в расчете на клетку) адипоцитами, выделенными из крыс различного веса. Позднее Аматруда и др. [84] сообщили об отсутствии

различий в связывании инсулина жировыми клетками, взятыми при операции у тучных и худых людей. Расхождение данных о содержании рецепторов инсулина при ожирении имеет по крайней мере четыре возможных объяснения. Во-первых, отсутствие различий в связывании гормона в исследованиях, выполненных на крысах, вероятно, объясняется тем, что в опытах были использованы животные не с ожирением, а просто различного веса и возраста (см. разд. VII, Е). Во-вторых, возможно, что при ожирении механизм регуляции рецепторов инсулина в жировой ткани отличается от механизмов его регуляции в других тканях. В-третьих, упомянутые расхождения можно объяснить различными методологическими подходами, так как Олефски и Ривн [85], изучавшие связывание инсулина адипоцитами крыс разного веса, все же обнаружили у них значительные различия в числе рецепторов инсулина. Еще одно объяснение состоит в том, что при ожирении жировые клетки подвергаются резкой гипертрофии, и поэтому число рецепторов на единицу площади поверхности клетки в большинстве случаев уменьшается, даже если число рецепторов на клетку остается постоянным [84]. Как было отмечено выше (разд. VI), лучше всего степень гормон-рецепторного связывания выражать числом рецепторов на единицу площади клетки.

Факторы, регулирующие концентрацию рецепторов при ожирении, многочисленны. У мышей со вторичным ожирением, возникающим в результате обработки препаратом тиоглюкозы (gold thioglucose), отмечается тесная корреляция между степенью ожирения, концентрацией инсулина в плазме и снижением концентрации рецепторов инсулина (табл. 4). В дальнейшем, когда с помощью диеты удается нормализовать вес этих животных, концентрация рецепторов также достигает нормы (табл. 4). Что же касается мы-

*Таблица 4*

**Повреждение рецепторов инсулина у мышей, обработанных препаратом тиоглюкозы (gold thioglucose)[1]**

| Животные | Вес тела, г | Инсулин в плазме, нг/мл | Связанный инсулин[2], фмоль, мг белка |
|---|---|---|---|
| Контрольные (худые) | 24,9 | 1,2 | 27,7±2,3 |
| Обработанные препаратом тиоглюкозы | | | |
| Вес не увеличен | 26,3 | 0,9 | 27,4—1,4 |
| Ожирение I | 39,0 | 6,2 | 19,8±0,7 |
| Ожирение II | 47,0 | 48,0 | 12,8±1,9 |
| Ожирение предотвращено с помощью диеты, нормальный вес | 24,8 | 0,6 | 27,8±3,7 |

[1] Составлено по данным, взятым из работ [78—80].
[2] Количество $^{125}$I-инсулина, специфически связанного при концентрации инсулина $1{,}7\cdot10^{-11}$ М и концентрации мембран 0,2 мг/мл.

шей ob/ob, то для них корреляции между весом тела, концентрацией инсулина в плазме и снижением содержания рецептора инсулина не обнаружено [78—80]. Причиной этого служит то обстоятельство, что использованные в опытах даже самые молодые животные (6,5 нед) были уже значительно ожиревшими и обладали всеми свойствами, характерными для инсулиновой резистентности, в том числе заметной гиперинсулинемией и пониженным содержанием рецепторов инсулина. Более того, даже если вес ожиревших мышей с гипергликемией удается довести до нормального путем постоянного ограничения в пище, то у этих животных все равно сохраняются аномально высокое содержание жира по отношению к общему весу тела, некоторая гиперинсулинемия и слегка пониженное число рецепторов инсулина.

Чтобы оценить роль таких переменных факторов, как рацион, ожирение, гиперинсулинемия и недостаточное содержание рецепторов инсулина, были проведены эксперименты, в которых животных подвергали кратковременному голоданию [78—80]. У мышей ob/ob, голодавших в течение 24 ч, наблюдались незначительная потеря веса, заметное падение концентрации инсулина в плазме и двукратное увеличение связывания инсулина (табл. 5). Если же

*Таблица 5*

**Влияние рациона и способа введения инсулина на связывание инсулина** [1]

| Животные | Условия | Связанный $^{125}$I-инсулин[2], фмоль//мг мембранного белка |
|---|---|---|
| Худые мыши (приплод худых родителей) | Обильное кормление | 34,5±1,1 |
| Мыши ob/ob | То же | 9,3±1,6 |
| Мыши ob/ob | 24-часовое голодание | 18,5±1,4 |
| Мыши ob/ob | 24-часовое голодание + 24-часовая обработка инсулином Rx[3] | 10,1±0,6 |
| Мыши ob/ob | 24-часовое голодание + 1-часовая обработка инсулином Rx[4] | 15,2±0,6 |

[1] Составлено по данным работ [78—80].
[2] Количество инсулина, специфически связанного с мембранами печени при концентрации инсулина $1{,}7 \cdot 10^{-11}$ М и концентрации мембран 0,2 мг/мл.
[3] Через каждые 12 ч животные получали 12—24 Ед (0,5—1,0 мг) инсулина NPH на мышь. Концентрация инсулина в сыворотке в момент забоя животных составляла 1—4 мкг/мл.
[4] За 1 ч до забоя животным подкожно вводили 12 Ед (0,5 мг) инсулина. Концентрация инсулина в сыворотке в момент забоя животных составляла 7 мкг/мл.

при голодании мыши получали инсулин, то они теряли незначительно в весе, но никакого падения концентрации инсулина в плазме и никакого увеличения числа рецепторов инсулина не обнаруживалось (табл. 5). В том случае, когда животные получали инсулин при 24-часовом голодании только в течение последнего часа,

содержание рецепторов увеличивалось в основном до такого же уровня, какой наблюдался у мышей, вообще не получавших инсулина. Эти данные позволяют предположить, что на концентрацию рецептора инсулина, возможно, влияет по типу отрицательной обратной связи само состояние хронической гиперинсулинемии.

Представление о том, что уровень инсулина в плазме может оказывать влияние по типу отрицательной обратной связи на содержание рецепторов инсулина, находится в соответствии с некоторыми другими наблюдениями. Так, мыши ob/ob после обработки стрептозотоцином или аллоксаном [86] обладают повышенной чувствительностью к инсулину по сравнению с необработанными мышами, так же как тучные люди, получавшие диазоксид — лекарственный препарат, который подавляет секрецию инсулина, — по сравнению с больными, не получавшими этот препарат [87]. Более того, Гавин и др. [88] продемонстрировали в условиях in vitro наличие временной зависимости снижения числа инсулинсвязывающих мест в лимфобластоидных клетках человека, культивируемых в среде с высоким содержанием инсулина. Наконец, если отложить на графике концентрацию инсулина в плазме против концентрации рецептора в мембранах печени самых разнообразных животных с ожирением, получается достаточно высокая степень корреляции между этими величинами, причем самый низкий уровень содержания рецепторов будет соответствовать наиболее высокому уровню гиперинсулинемии [80, 89].

Результаты экспериментов по трансплантации островков поджелудочной железы нормальных животных мышам с ожирением позволили предположить, что островки секретируют какое-то другое, отличное от инсулина, соединение, которое оказывает влияние на насыщение инсулиновых рецепторов или на чувствительность к самому гормону. Пересадка островков нормальных мышей как мышам ob/ob [90], так и мышам NZO [81] приводит к устранению ожирения и связанных с ним метаболических изменений, а у мышей NZO сопровождается увеличением связывания инсулина в печени [81]. Однако, поскольку это увеличение сопровождается уменьшением концентрации глюкозы и инсулина в крови за счет соответствующего рациона, можно полагать, что трансплантированные островки в основном предотвращают гиперфагию, а не прямо влияют на концентрацию инсулинового рецептора.

У тучных людей удалось показать недостаточное содержание рецепторов инсулина в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови [53]. Правда, в этом случае провести количественное определение рецепторов довольно трудно, тем не менее и здесь основные изменения, очевидно, происходят за счет уменьшения числа рецепторов, а не уменьшения их сродства. У тучных людей, как и у мышей с ожирением, при ограничении в питании повышается резистентность к инсулину, что приводит к увеличению числа рецепторов [54].

Исходя из литературных данных, механизм возникновения устойчивости к инсулину при ожирении можно схематически представить так, как это показано на рис. 8. При увеличении поступления пищи содержание глюкозы в крови, очевидно, несколько повышается, что стимулирует увеличение концентрации инсулина в плазме. Гиперинсулинемия приводит к снижению концентрации рецепторов инсулина и, таким образом, к уменьшению чувствительности ткани к инсулину и дальнейшему увеличению содержания глюкозы в крови. Новое устойчивое состояние достигается в том случае, когда благодаря гиперинсулинемии регулируется содержание сахара в крови, а за счет повышенной чувствительности к инсулину предотвращается дальнейшее снижение числа рецепторов инсулина под действием этого гормона. Уменьшение чувствительности к инсулину может также влиять на количество поглощаемой пищи, так как гипоталамический центр насыщения, по-видимому, чувствителен к инсулину [91, 92].

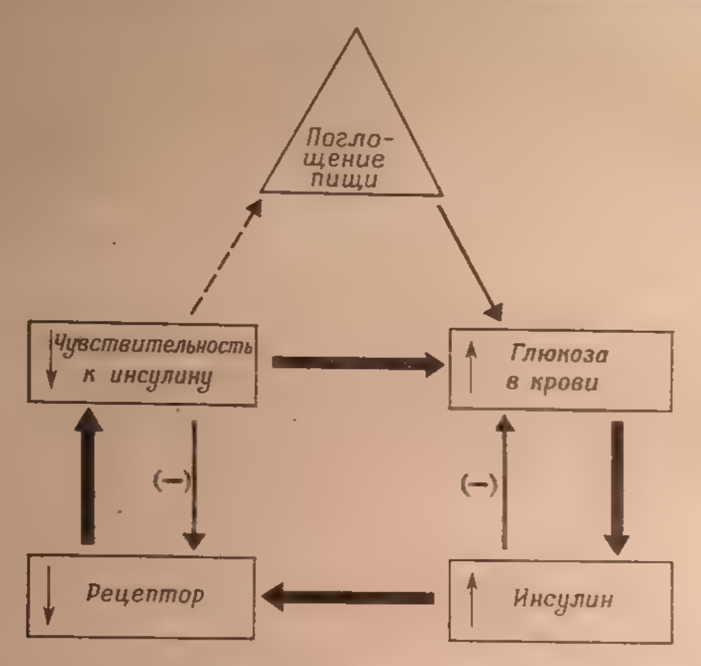



Рис. 8. Модель патогенеза резистентности к инсулину при ожирении.

## Б. Влияние рациона на связывание инсулина

Рацион, его количественный и качественный состав, оказывает большое влияние на связывание инсулина. К сожалению, до сих пор этот вопрос детально не изучен. Мы наблюдали увеличение связывания инсулина как у худых мышей, так и у мышей ob/ob, голодавших в течение 24 ч [78—80]; у тучных людей при полном голодании были отмечены еще более резкие изменения в степени гормон-рецепторного связывания (Бар, неопубликованные дан-

ные). Правда, в указанных экспериментах изменения в рационе были доведены до возможного предела.

Влияние состава пищи на связывание инсулина довольно подробно изучено Теппермэном и сотр. [93], которые показали, что у крыс, получавших богатую жирами пищу, наблюдалось заметное уменьшение связывания инсулина адипоцитами, хорошо коррелировавшее с уменьшением стимулированного инсулином окисления глюкозы. В данном случае оказалось, что природа пищевого жира также имеет существенное значение, поскольку связывание инсулина и стимулированное инсулином окисление глюкозы снижалось в большей степени у крыс, получавших пищу, богатую насыщенными жирами, чем у животных, в рацион которых были включены ненасыщенные жиры. Аналогичные результаты получили Демейер и сотр. [94]. Вместе с тем Кашмэн и Сэйлэнс [95] не обнаружили никаких изменений в связывании инсулина у крыс, содержащихся на богатой жирами пище, хотя окисление глюкозы, стимулированное инсулином, уменьшалось; данные о природе использованных жиров в этом предварительном сообщении отсутствуют. Тот факт, что пища может оказывать существенное влияние на связывание инсулина, подчеркивает необходимость получения подробной информации об используемых в экспериментах животных и условиях их содержания, а также о клетках и препаратах мембран, выделенных из животных.

### В. Резистентность к инсулину, индуцируемая гормонами

У человека и животных избыточная концентрация как глюкокортикоидов, так и гормона роста связана с устойчивостью к инсулину и нарушением толерантности к глюкозе. Ярким примером этого типа инсулиновой резистентности служат крысы с трансплантированной опухолью гипофиза MtT, которая секретирует АКТГ, гормон роста и пролактин. Голдфайн и сотр. [96] показали, что у этих животных наблюдается значительное уменьшение связывания инсулина (рис. 9, *А*) мембранами печени, тогда как связывание глюкагона остается без изменений (рис. 9, *Б*). Уменьшение связывания инсулина можно устранить посредством адреналэктомии; при этом высокая концентрация гормона роста и АКТГ в крови сохраняется. Аналогичное уменьшение связывания инсулина было обнаружено у нормальных крыс, получавших АКТГ и дексаметазон в больших дозах, тогда как согласно предварительным данным, у животных, обработанных одним лишь гормоном роста, или у людей с акромегалией, уменьшения связывания не наблюдалось [97]. Таким образом, резистентность к инсулину, связанная с избытком глюкокортикоидов, по-видимому, сопровождается уменьшением связывания инсулина. В отличие от этого избыток гормона роста не влияет на инсулинсвязывающие места. Олефски и др. [98] получили аналогичные данные в экспериментах с жиро-

вой тканью крыс, обработанных глюкокортикоидами, тогда как Беннетт и Куатреказас [99] в идентичных исследованиях не обнаружили никаких изменений в связывании инсулина. Причина расхождения этих данных пока не выяснена.

Точная природа нарушения, приводящего к уменьшению связывания инсулина, остается пока не определенной. Анализ кривых насыщения позволяет предположить, что в этом случае число рецепторов, возможно, не изменяется, а уменьшение связывания обусловливается изменением сродства рецепторов или эффектом коопе-

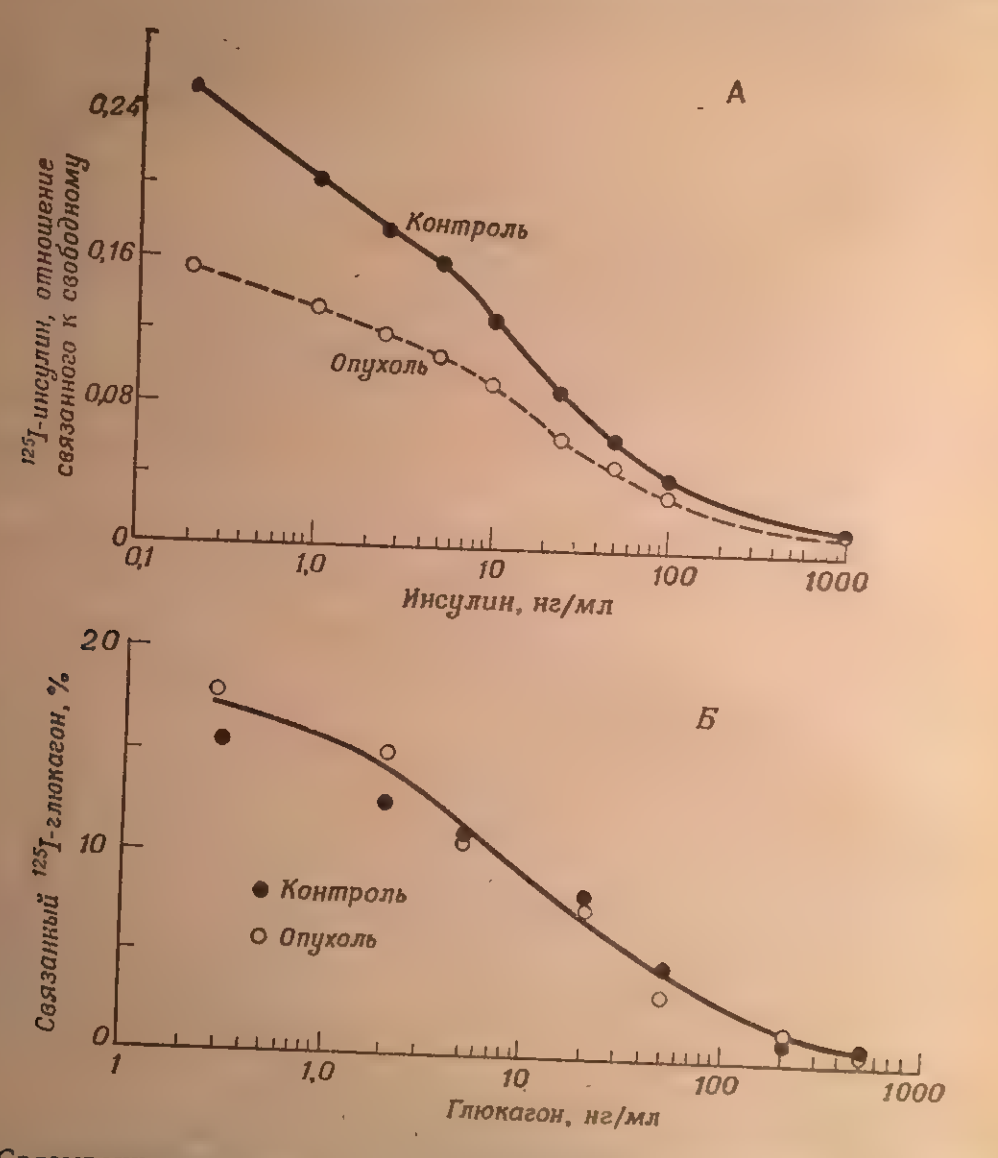



**Рис. 9.** Связывание инсулина и глюкагона мембранами печени крыс с индуцированной гормоном резистентностью к инсулину. *А*. Связывание $^{125}$I-инсулина плазматическими мембранами печени нормальных крыс и крыс с резистентностью к инсулину (приобретенной в результате имплантации опухоли гипофиза MtT, секретирующей гормон роста, пролактин и АКТГ) определяли после инкубации в течение 6 ч при 20° С. *Б*. Связывание $^{125}$I-глюкагона плазматическими мембранами печени вышеупомянутых животных определяли после инкубации в течение 1 ч при 20° С [96].

ративности. Совершенно очевидно, что в этом направлении необходимы дальнейшие исследования.

Беременность является состоянием резистентности к инсулину: в возникновении и поддержании этого состояния участвуют многие факторы, и главнейшим из них, по-видимому, является повышенная секреция плацентарного лактогена (пептида, подобного гормону роста). Пока еще систематические исследования беременности в этом плане не проводились. Согласно предварительным данным Келли и др. [100], можно предположить, что в процессе беременности происходит увеличение связывания инсулина в печени, почках и плаценте. Вместе с тем О'Киф и Куатреказас [101] не обнаружили никаких изменений в связывании инсулина в молочной железе при беременности, но показали значительное увеличение его связывания в период лактации. Было бы интересно связать эти данные с физиологией беременности и лактации.

### Г. Диабет

Результаты изучения рецепторов инсулина у человека при диабете весьма противоречивы. Так, Арчер и др. [53], обследуя небольшую группу случайно отобранных больных диабетом без признаков ожирения, не обнаружили у них значительного изменения в связывании инсулина мононуклеарными лейкоцитами. Вместе с тем Олефски и Ривн [58], обследуя группу из 20 неподвергавшихся лечению худых взрослых больных диабетом без кетоацидоза, показали, что количество рецепторов инсулина в этих же клетках уменьшается приблизительно на 50%. В последнем случае у больных при голодании наблюдалась также слабая гиперинсулинемия. Ни в одном из вышеупомянутых исследований число моноцитов в препаратах, приготовленных по Бойюму, не определяли, так как последние были получены раньше, чем было показано, что инсулинсвязывающими клетками являются моноциты. Чтобы оценить значение этих данных, необходимы дальнейшие исследования. Поскольку неосложненный диабет обычно не сопровождается заметной резистентностью к инсулину, маловероятно, чтобы при этом заболевании рецепторы подвергались существенным изменениям.

Недавно нам предоставилась возможность обследовать шесть пациенток с особым диабетическим синдромом, при котором отмечалась необычайно высокая резистентность к инсулину [102]. Все пациентки имели нормальное распределение жира и акантоз. С помощью внутривенных тестов на толерантность к инсулину у них была выявлена заметная резистентность к гормону; так, для регуляции концентрации глюкозы в крови трем пациенткам пришлось вводить 10 000—48 000 Ед инсулина в день. Кроме того, повышенная концентрация инсулина в плазме, как базальная (от 80 до 300 мкЕд/мл при норме 11±5 мкЕд/мл), так и стимулируемая глюкозой после перорального приема (вплоть до 3000 мкЕд/мл при

норме 103±68 мкЕд/мл), отражает заметную резистентность к инсулину. Причина столь необычной резистентности остается непонятной. У пациентов с такой формой резистентности связывание инсулина циркулирующими мононуклеарными лейкоцитами составляло всего лишь 5—40% по сравнению со здоровыми людьми. В одних случаях это нарушение, по-видимому, связано с уменьшением числа рецепторов, тогда как в других — со снижением сродства или кооперативным эффектом. В исследованных препаратах клеток число моноцитов, а также их морфология, гистохимическое окрашивание и фагоцитоз были в пределах нормы. Голодание, которое вызвало у пациенток снижение концентрации инсулина в крови до нормальной, не приводило к увеличению связывания этого гормона. Таким образом, в отличие от ожирения при этом синдроме повреждение рецепторов инсулина, по-видимому, не является вторичным по отношению к гиперинсулинемии. Результаты недавних исследований, проведенных в нашей лаборатории Флайером и сотр. [103], дают возможность предположить, что в плазме некоторых больных содержатся антитела, которые блокируют связывание инсулина с его рецептором. В настоящее время проводится изучение свойств этих антител и природы взаимодействия рецепторов с антителами. Полученные данные позволяют выдвинуть новую концепцию возможных механизмов резистентности инсулина и будут успешно использованы в дальнейших исследованиях рецепторов. У некоторых больных повреждение рецепторов может оказаться первичным генетическим нарушением.

Экспериментально вызванный диабет у животных не является адекватной моделью этого заболевания у человека, что затрудняет интерпретацию данных, полученных на модельных животных. Беннетт и Куатреказас [99] не обнаружили изменений в связывании инсулина адипоцитами крыс, диабет у которых был вызван стрептозотоцином. Вместе с тем Хепп и др. [104] отмечают увеличение числа рецепторов инсулина у китайских хомячков при диабете, что согласуется с представлением об обратно пропорциональной зависимости концентрации рецепторов инсулина от концентрации инсулина в окружающей среде.

## Д. Ацидоз

Ацидоз представляет собой другое состояние резистентности к инсулину, при котором рецептор также может играть существенную роль. Связывание инсулина с рецептором in vitro чрезвычайно чувствительно к pH, причем оптимум связывания лежит при pH 7,8—8,0 как для интактных клеток [27], так и для высокоочищенных препаратов плазматических мембран [23]. Изменение pH от 7,4 до 6,8, часто наблюдаемое при диабетическом кетоацидозе, приводит к снижению связывания инсулина с рецептором более чем на

50%. Такое уменьшение связывания, очевидно, обусловлено снижением сродства гормона к рецептору. При устранении ацидоза связывание быстро восстанавливается.

### Е. Влияние возраста на связывание инсулина

При изучении влияния возраста на рецепторы инсулина были получены противоречивые результаты. Фримэн и сотр. [105] показали, что у крыс с возрастом в период со 2-го по 24-й месяц связывание инсулина очищенными плазматическими мембранами печени уменьшается приблизительно на 60%, причем это уменьшение обусловлено изменением числа рецепторов, а не их сродства. Наряду с этим Олефски и Ривн [85], изучая тот же вопрос и используя адипоциты крыс в возрасте от 40 до 170 дней, обнаружили уменьшение связывания инсулина только в течение первых двух месяцев жизни этих животных, после чего они не наблюдали никаких изменений в течение последующих четырех месяцев. Содержание 75-дневных крыс на строгой диете привело к увеличению связывания инсулина у этих животных по сравнению со связыванием у 45-дневных крыс. Следует отметить, что ни в одном из этих исследований не были поставлены контроли для дифференциального отбора клеток или мембран, выделяемых из животных различного возраста.

В описываемых ниже трех работах были получены противоположные рассмотренным выше результаты относительно влияния старения на связывание инсулина с рецептором. Голдфайн [107] при изучении связывания инсулина и стимуляции транспорта аминокислот в лимфоциты тимуса молодых крыс показал, что у этих животных в возрасте от 3 до 10 нед наблюдается постепенное уменьшение стимулируемого инсулином транспорта аминокислот, тогда как связывание инсулина остается без изменений. Аналогичные результаты получили Ливингстон и др. [83] при изучении адипоцитов животных весом от 160 до 400 г (что соответствует приблизительно возрасту от 6 до 12 нед), у которых уменьшение окисления глюкозы не сопровождалось изменениями в связывании инсулина. И наконец, нам также не удалось обнаружить соответствующего изменения в связывании инсулина мембранами печени мышей ob/ob или худых мышей в возрасте от 6 нед до 6 мес; правда, этот вопрос изучен еще недостаточно [80].

### Ж. Состояние повышенной чувствительности

Избыток гормона роста и глюкокортикоидов сопровождается резистентностью к инсулину, тогда как недостаток этих гормонов — повышенной чувствительностью к инсулину. Роль рецепторов инсулина в увеличении чувствительности к этому гормону определить довольно трудно. У крыс с трансплантированной опухолью гипо-

физа MtT, секретирующей АКТГ, гормон роста и пролактин, адреналэктомия приводит к незначительному повышению связывания инсулина по сравнению с нормой [97]. У нормальных животных последствия адреналэктомии до сих пор еще не изучены. Небольшое увеличение связывания отмечено также для мембран печени [98, 106] и тимоцитов гипофизэктомированных крыс, причем в последнем случае показано усиление транспорта аминокислот, стимулированного инсулином [107]. Однако обнаруживаемые в обоих исследованиях изменения незначительны, и не ясно, связаны ли они с изменениями числа рецепторов или их сродства. В отличие от этих данных Арчер и др. [53] не выявили никаких достоверных изменений в связывании инсулина мононуклеарными лейкоцитами у четырех пациентов с гипофункцией гипофиза. Возможные изменения рецепторов инсулина при других чувствительных к инсулину состояниях, например при физической нагрузке, пока еще не изучены.

## Благодарность

Авторы приносят благодарность мисс Кэрол Шинн за неоценимую помощь в подготовке главы для печати.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. *Yalow R. S., Berson S. A.*, J. Clin. Invest.. *39*, 1157—1175 (1960)
2. *Levine R., Goldstein M. S., Huddlestun B., Klein S.*, Am. J. Physiol , *163*, 70 (1950).
3. *Stadie W. C., Haugaard N., Marsh J. B., Hills A. G.*, Am. J. Med. Sci., *218*, 265—274 (1949).
4. *Pastan I., Roth J., Macchia V.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *56*, 1802 1809 (1966).
5. *Kono T.*, J. Biol. Chem., *244*, 1772—1778 (1969).
6. *Schimmer B. P., Ueda K., Sato G. H.*, Biochem. Biophys. Res. Commun , *32*, 806—811 (1968).
7. *Cuatrecasas P.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *63*, 450 (1969).
8. *Kolb H. J., Renner R., Hepp K. D., Weiss L., Wieland O. H.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 248—252 (1975).
9. *Katzen H. M., Vlahakes G. J.*, Science, *179*, 1142—1143 (1973).
10. *Butcher R. W., Crofford O. B., Gammeltoft S., Gliemann J., Gavin J. R., III, Goldfine I. D., Kahn C. R., Rodbell M., Roth J.*, Science, *182*, 396—397 (1973)
11. *Stadie W. C., Haugaard N., Vaughn M.*, J. Biol., Chem. *200*, 745—751 (1953).
12. *Crofford O. B.*, J. Biol. Chem., *243*, 362—369 (1968)
13. *Arquilla E. R., Ooms H., Mercola K*, J. Clin. Invest., *47*, 474—486 (1968).
14. *Newerly K., Berson S. A.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., *94*, 751—755 (1957).
15. *Lefkowitz R. J., Roth J., Pricer W., Pastan I.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *65*, 745—752 (1970).
16. *Lin S., Ellis H., Weisblum B., Goodfriend T. L.*, Biochem. Pharmacol., *19*, 651—662 (1970).
17. *Goodfriend T. L., Lin S.*, Circ Res., *26—27* (Suppl. 1), I-163-I-174 (1970).
18. *Kahn C. R.*, in: Methods in Membrane Biology (E. D. Korn, ed.), Vol. 3, Plenum, New York, 1975. pp. 81—146.
19. *Roth J.*, Metabolism, *22*, 1059—1073 (1973).

20. *Posner B. I., Kelly P. A., Shiu R. P. C., Friesen H. G.*, Endocrinology, *95*, 521—531 (1974).
21. *Freychet P., Roth J., Neville D. M., Jr.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *68*, 1833—1837 (1971).
22. *Freychet P., Kahn C. R., Roth J., Neville D. M., Jr.*, J. Biol. Chem., *247*, 3953—3961 (1972).
23. *Freychet P., Kahn C. R., Roth J., Neville D. M., Jr.*, in: Endocrinology (R. O. Scow, ed.), Proc. 4th Int. Congr. Endocrinol. 1972, Int. Congr. Ser. No. 256, Excerpta Medica, Amsterdam, 1973, pp. 335—340.
24. *Freychet P., Rosselin G., Rancon K. F., Fouchereau M., Broer Y.*, Horm. Metab. Res., Suppl. 5, 72—78 (1974).
25. *Kahn C. R., Freychet P., Neville D. M., Jr., Roth J.*, J. Biol. Chem., *249*, 2249—2257 (1974).
26. *Gavin J. R., III, Roth J., Jen P., Freychet P.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 747—751 (1972).
27. *Gavin J. R., III, Gorden P., Roth J., Archer J. A., Buell D. N.*, J. Biol. Chem., *248*, 2202—2207 (1973).
28. *Kono T.*, in: Insulin Action (I. B. Fritz, ed.), Academic Press, New York, 1972, pp. 171—205.
29. *Kono T., Barham F. W.*, J. Biol. Chem., *246*, 6210—6216 (1971).
30. *Cuatrecasas P.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *68*, 1264—1268 (1971).
31. *Cuatrecasas P.*, J. Biol. Chem., *246*, 7265—7274 (1971).
32. *Gammeltoft S., Gliemann J.*, Biochem. Biophys. Acta, *320*, 16—32 (1973).
33. *Gliemann S., Gammeltoft S., Vinter J.*, J. Biol. Chem., *250*, 3368—3374 (1975).
34. *Hammond J. M., Jarett L., Mariz I. K., Daughaday W. H.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *49*, 1122—1128 (1972).
35. *Goldfine I. D., Gardner J. D., Neville D. M., Jr.*, J. Biol. Chem., *247*, 6919—6926 (1972).
36. *Olefsky J. M., Jen P., Reaven G. M.*, Diabetes, *23*, 565—571 (1974).
37. *Posner B. I.*, Diabetes, *23*, 209—217 (1974).
38. *Ginsberg B., Kahn C. R.*, Clin. Res., *23*, 321 A (1975).
39. *Freychet P., Brandenburg D., Wollmer A.*, Diabetologia, *10*, 1—5 (1974).
40. *Gliemann J., Gammeltoft S.*, Diabetologia, *10*, 105—113 (1974).
41. *De Meyts P., Kahn C. R., Ginsberg B., Roth J.*, Diabetes, *24* (Suppl. 2), 393 (1975).
42. *Cuatrecasas P., Hollenberg M. D.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *62*, 31—41 (1975).
43. *Cuatrecasas P., Desbuquois B., Krug F.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *44*, 333—339 (1971).
44. *De Meyts R., Roth J., Neville D. M., Jr., Gavin J. R., III, Lesniak M. A.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *55*. 154—161 (1973).
45. *Scatchard G.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., *51*, 660—672 (1949).
46. *Soll A. H., Kahn C. R., Neville D. M., Jr.*, J. Biol. Chem., *250*, 7402—7407 (1975).
47. *Gavin J. R., III, Buell D. N., Roth J.*, Science, *178*, 168—169 (1972).
48. *Bergeron J. J. M., Evans W. H., Geschwind I. I.*, J. Cell Biol., *59*, 771—776 (1973).
49. *Horvat A., Li E., Katsoyannis P. G.*, Biochim. Biophys. Acta, *382*, 609—620 (1975).
50. *Jarett L., Smith R. M., Crespin S. R.*, Endocrinology, *94*, 719—729 (1974).
51. *Neville D. M., Jr.*, in: Methods in Membrane Biology (E. D. Korn, ed.), Vol. 3, Plenum, New York, 1975, pp. 1—49.
52. *Neville D. M.. Jr., Kahn C. R.*, in: Methods in Molecular Biology (A. I. Laskin and J. A. Last, eds.), Vol. 5, Subcellular Particles, Structures and Organelles, Marcel Dekker, New York, 1974. pp. 57—85.
53. *Archer J. A., Gorden P., Gavin J. R., III, Lesniak M. A., Roth J.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *36*, 627—533 (1973).
54. *Archer J. A., Gorden P., Roth J.*, J. Clin. Invest., *55*, 166—174 (1975).
55. *Böyum A.*, Scand. J. Clin. Lab. Invest., *21* (Suppl. 97), 77—89 (1968).

56. *Schwartz R. H., Bianco A. R., Handwerger B. S., Kahn C. R.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 474—478 (1975).
57. *Olefsky J., Reaven G. M.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *38*, 554—560 (1974).
58. *Olefsky J. M., Reaven G. M.*, J. Clin. Invest., *54*, 1323—1328 (1974).
59. *Krug U., Krug F., Cuatrecasas P.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 2604—2608 (1972).
60. *Cuatrecasas P.*, Ann. Rev. Biochem., *43*, 169—214 (1974).
61. *Desbuquois B., Cuatrecasas P.*, Ann. Rev. Med., *24*, 233—240 (1973).
62. *Birnbaumer L., Pohl S. L.*, J. Biol. Chem., *248*, 2056—2061 (1973).
63. *Catt K. J., Dufau M. L.*, Nature, New Biol., 244, 219—221 (1973).
64. *Moore W. V., Wolff J.*, J. Biol. Chem., *249*, 6255—6263 (1974).
65. *Lefkowitz R. J., Roth J., Pastan I.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., *185*, 195—209 (1971).
66. *Levitzki A.*, J Theor. Biol., *44*, 367—372 (1974).
67. *Levitzki A., Segel L. A., Steer M. L.*, J. Mol. Biol., *91*, 125—130 (1975).
68. *Jarett L., Smith R. M.*, J. Biol. Chem., *249*, 7024—7031 (1974).
69. *Orci L., Bataille D. P., Freychet P.*, Clin. Res., *23*, 422A (1975).
70. *Rabinowitz D.*, Ann. Rev. Med., *21*, 241—258 (1970).
71. *Gavin J. R., III, Kahn C. R., Gorden P., Roth J., Neville D. M., Jr.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *41*, 438—445 (1975).
72. *Stauffacher W., Orci L., Camercon D. P., Burr I. M., Renold A. E.*, Recent. Prog. Horm. Res., *27*, 41—95 (1971).
73. *Kahn C. R., Neville D. M., Jr., Gorden P., Freychet P., Roth J.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *48*, 135—142 (1972).
74. *Kahn C. R., Neville D. M., Jr., Roth J.*, J. Biol. Chem., *248*, 244—250 (1973).
75. *Freychet P., Laudat M. H., Laudat P., Rosselin G., Kahn C. R., Gorden P., Roth J.*, FEBS Lett., *25*, 339 (1972).
76. *Freychet P., Forgue E.*, Diabetes, *23* (Suppl. 1), 354 (1974).
77. *Soll A. H., Goldfine I. D., Roth J., Kahn C. R., Neville D. M., Jr.*, J. Biol. Chem., *249*, 4127—4131 (1974).
78. *Kahn C. R., Soll A. H., Neville D. M., Jr., Goldfine I. D., Archer J. A., Gorden P., Roth J.*, Proceedings of the Fogarty Conference on Obesity, Vol. II. Part 2, U. S. Gov't. Printing Office, Washington, D. C. (1975), pp. 301—311.
79. *Kahn C. R., Soll A. H., Neville D. M., Jr., Roth J.*, Clin. Res., *21*, 628 (1973).
80. *Soll A. H., Kahn C. R., Neville D. M., Jr., Roth J.*, J. Clin. Invest., *56*, 769—780 (1975).
81. *Baxter D., Gates R. J., Lazarus N. R.*, 8th Congress of the International Diabetes Federation, July 15—20, 1973, Int. Cong. Ser. No. 280, Excerpta Medica, Amsterdam. 1973, p. 74.
82. *Marinetti G. V. Schlatz L., Reilly K.*, in: Insulin Action (I. B. Fritz, ed.), Academic Press, New York, 1972, pp. 207—276.
83. *Livingston J. N., Cuatrecasas P., Lockwood D. H.*, Science, *177*, 626—628 (1972).
84. *Amatruda J. M., Livingston J. N., Lockwood D. H.*, Science, *188*, 264—266 (1975).
85. *Olefsky J., Reaven G. M.*, Clin. Res., *23*, 112A (1975).
86. *Mahler R. J., Szabo O.*, Am. J. Physiol., *221*, 980—983 (1971).
87. *Mahler R. J.*, 8th Congress of International Diabetes Federation, Brussels, July 15—20, 1973, Int. Cong. Ser. No. 280, Excerpta Medica, Amsterdam, 1973, 156.
88. *Gavin J. R., Roth J., Neville D. M., Jr., De Meyts P., Buell D. N.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *71*, 84—88 (1974).
89. *Roth J., Kahn C. R., Lesniak M. A., Gorden P., De Meyts P., Megyesi K., Neville D. M., Jr., Gavin J. R., III, Soll A. H., Freychet P., Goldfine I. D., Bar R. S., Archer J. A.*, Recent Prog. Horm. Res., *31*, 95—139 (1975).
90. *Strautz R. L.*, Diabetologia, *6*, 306—312 (1970).
91. *Baile L. A., Herrera M. G., Mayer J.*, Am. J. Physiol., *218*, 857—863 (1970)
92. *Debons A. F., Krimsky I., From A., Cloutier R. J.*, Am. J. Physiol., *217*, 1114—1118 (1969).

93. *Tepperman H. M., Ip C., Holohan P., Tepperman J.*, в печати.
94. *Demeyer D. I., Tau W. C., Privett O. S.*, Lipid, *9*, 1—7 (1974).
95. *Cushman S. W., Salans L. B.*, Clin. Res., *23*, 317A (1975).
96. *Goldfine I. D., Kahn C. R., Neville D. M., Jr., Roth J., Carrison M. M., Bates R. W.*, Biochem. Biophys Res. Commun., *53*, 852—857 (1973).
97. *Kahn C. R., Goldfine I. D., Neville D. M., Jr., Roth J., Garrison M. M., Bates R. W.*, Program of the 55 th Meeting of the Endocrine Society, 1973, p. 168.
98. *Olefsky J. M., Johnson J., Liu F., Jen P., Reaven G. M.*, Metabolism, *24*, 517—527 (1975).
99. *Bennett V. G., Cuatrecasas P.*, Science, *176*, 805—806 (1972).
100. *Kelly P. A., Posner B. I., Tsushima T., Friesen H. G.*, Endocrinology, *95*, 532—539 (1974).
101. *O'Keefe E., Cuatrecasas P.*, Biochim. Biophys. Acta, *343*, 64—77 (1974).
102. *Kahn C. R., Flier J. S., Bar R. S., Archer J. A., Gorden P., Martin M. M., Roth J.*, N. Eng. J. Med., *294*, 739—745 (1976).
103. *Flier J. S., Kahn C. R., Roth J., Bar R. S.*, Science, *190*, 63—65.
104. *Hepp K. D., Langley J., Von Funcke H. J., Renner R., Kemler W.*, Nature, *258*, 154 (1975).
105. *Freemen C., Karoly K., Adelman R. C.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *54*, 1573—1580 (1973).
106. *Posner B. I., Kelly P. A., Friesen H. G.*, Science, *188*, 57—59 (1975).
107. *Goldfine I. D.*, Endocrinol., *97*, 948—954 (1975).

## Глава 2

# РЕЦЕПТОР ИНСУЛИНА

*С. ДЖЕЙКОБС*[1] *И П. КУАТРЕКАЗАС*[1]

Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics and Department of Medicine
The Johns Hopkins University School of Medicine
Baltimore, Maryland

## I. ВВЕДЕНИЕ

Рецепторы инсулина можно определить как молекулы, которые узнают инсулин и передают информацию о его присутствии, что при соответствующих обстоятельствах приводит к биологическим эффектам, характерным для инсулина. Первичный процесс в механизме действия инсулина — узнавание — состоит в связывании инсулина с рецептором. Этот процесс тщательно изучен в различных лабораториях (для общего ознакомления см. [1—3]). Большие успехи достигнуты в идентификации, изучении свойств и выделении рецепторов инсулина. Меньше известно о процессе, благодаря которому связывание инсулина с рецептором приводит к биологически значимому ответу.

## II. СВЯЗЫВАНИЕ ИНСУЛИНА С РЕЦЕПТОРОМ И КОРРЕЛЯЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ С БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Инсулин связывается со стеклом, тальком, бумагой и некоторыми биологическими материалами. Такое связывание может характеризоваться высоким сродством, насыщаемостью и даже быть до некоторой степени специфичным [4]. Отсюда ясно, что не все инсулинсвязывающие места являются рецепторами инсулина. Любой предполагаемый рецептор инсулина должен обладать как способностью узнавать гормон (т. е. связываться с ним), так и передавать информацию о его присутствии. В конечном итоге строгое доказательство того, что данная структура является рецептором, по-видимому, состоит в следующем: необходимо выделить и очистить предполагаемый рецептор, затем встроить его в искусственную мембрану и показать, что он сохраняет биологическую активность.

[1] Настоящий адрес: The Wellcome Research Laboratories Research Triangle Park, North Carolina.

Пока такие доказательства не получены ни для одной рецепторной системы. Вместе с тем в мембранах жировых клеток и клеток печени идентифицированы инсулинсвязывающие места, обладающие высоким сродством, насыщаемостью и строгой химической специфичностью. Связывание инсулина этими местами настолько хорошо коррелирует со степенью биологической активности инсулина, что функционирование указанных мест в качестве рецепторов инсулина вполне возможно.

### А. Число и сродство рецепторов

$^{125}$I-инсулин, тщательно приготовленный с помощью хлорамина Т и в среднем содержащий один атом иода на молекулу инсулина, идентичен нативному гормону как в отношении способности связываться с изолированными интактными жировыми клетками, так и в отношении инициации биологического ответа [5, 6]. Такой иодированный инсулин обратимо связывается с высоким сродством с ограниченным числом связывающих мест интактных жировых клеток [6], а также мембран жировых клеток [8] и печени [5, 9] (это связывание зависит от времени и температуры). На одну жировую клетку приходится около 10 000 таких мест, обладающих высоким сродством. Константа диссоциации для связывания инсулина с этими местами, равная приблизительно $10^{-10}$ М, лежит в пределах физиологических значений [8, 9]. Угнетение липолиза и стимуляция транспорта глюкозы под влиянием инсулина находятся почти в прямой пропорциональной зависимости от количества связавшегося с этими местами $^{125}$I-инсулина [6]. Насыщение мест связывания, обладающих высоким сродством, угнетение липолиза и стимуляция транспорта глюкозы — все эти процессы, происходящие в интактных изолированных жировых клетках под влиянием инсулина, осуществляются при одной и той же концентрации гормона 30 мкЕд/мл [6].

### Б. Специфичность

$^{125}$I-инсулин вытесняется из комплекса со связывающими местами нативным инсулином и его производными, но не другими гормонами (исключение составляет соматомедин, обладающий инсулиноподобной активностью [10, 11]). Способность проинсулина и производных инсулина вытеснять $^{125}$I-инсулин непосредственно коррелирует со степенью их активности [5—9]. Это справедливо также для инсулинов различных видов животных [5].

### В. Локализация в клетке

Рецептор инсулина локализован на внешней поверхности клеточной мембраны. Инкубация интактных жировых клеток в среде, содержащей трипсин, приводит к полному подавлению как связы-

вания инсулина, характеризующегося высоким сродством и насыщаемостью, так и биологической чувствительности к инсулину [12, 13]. Это происходит даже в том случае, если трипсин ковалентно присоединен к гранулам агарозы, размер которых в несколько раз превышает размер жировых клеток, что исключает проникновение фермента в клетку [13].

После гомогенизации изолированных жировых клеток связывающую активность можно количественно обнаружить в соответствующих фракциях частиц, выделенных с помощью дифференциального ультрацентрифугирования и центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Показано [6—8], что связывание инсулина с ядерной и митохондриальной фракциями незначительно. Связывающая активность почти целиком обнаруживается в микросомной фракции. Поскольку гомогенизированная ткань утрачивает чувствительность к инсулину, чтобы убедиться в том, что связывающая активность, обнаруживаемая во фракции микросом, принадлежит рецептору инсулина, необходимо показать сходство свойств микросомного рецептора со свойствами рецептора интактной жировой клетки. Оказалось, что эта фракция частиц и интактные клетки имеют одинаковое число связывающих мест, а также одинаковые константы диссоциации и сходные кинетические параметры связывания инсулина [8]. Химические модификации (которые следует обсудить) вызывают сходные изменения в связывании как с мембранами жировых и печеночных клеток, так и с интактными жировыми клетками. В частности, если интактные жировые клетки подвергнуть действию свободного трипсина или трипсина, присоединенного к агарозе, то клетки утрачивают способность связывать с высоким сродством инсулин, и эта способность не восстанавливается после отмывания клеток от фермента, их гомогенизации и выделения соответствующей фракции.

Возможно, наиболее убедительным доказательством локализации рецептора инсулина на поверхности клетки служит тот факт, что производные инсулина, ковалентно присоединенные к гранулам агарозы, вызывают увеличение утилизации глюкозы и подавление стимулируемого гормоном липолиза в изолированных интактных жировых клетках [14]. Особенно интересными представляются производные агарозы, к которым инсулин присоединен через сополимеры аминокислот с разветвленной боковой цепью, благодаря чему утечка свободного инсулина в среду незначительна. Такие производные инсулина эффективно стимулируют синтез РНК [15] и накопление α-аминоизомасляной кислоты в изолированных клетках молочной железы [16, 17] и, кроме того, активируют синтез гликогена в печени [18]. Активация окисления глюкозы в присутствии субоптимальных концентраций инсулина, связанного с агарозой, протекает линейно во времени без латентного периода. Маловероятно, чтобы этот процесс осуществлялся под действием гормона, отщепившегося от полимера [14].

Вывернутые пузырьки мембран жировых клеток, приготовленные таким образом, что внешняя поверхность мембран оказывается внутри пузырька, не связывают $^{125}$I-инсулин [19]. Связывающие свойства пузырьков восстанавливаются после их гомогенизации, что свидетельствует о локализации рецептора инсулина на внешней поверхности мембраны. Если пузырьки приготовить так, чтобы $^{125}$I-инсулин удерживался внутри них, то после отмывания свободного меченого гормона дальнейшего освобождения меченого инсулина из пузырьков не наблюдается. Эти данные позволяют предположить, что рецептор инсулина не способен перемещаться поперек мембраны посредством перескока — так называемого флип-флопа.

## Г. Химическая природа рецептора инсулина

Основные данные о химической природе рецептора инсулина получены в экспериментах по расщеплению рецепторов ферментами. Когда жировые клетки подвергаются перевариванию трипсином в очень мягких условиях (10 мкг/мл фермента в течение 15 мин в присутствии 1%-ного альбумина), клетка теряет способность отвечать на инсулин (превращать равномерно меченную $^{14}$C-глюкозу в $^{14}CO_2$), если последний используется в низких концентрациях, хотя, если гормон используется в достаточно высоких концентрациях, может быть получен максимальный ответ. Это изменение биологической чувствительности клеток сопровождается параллельными изменениями сродства рецепторов к инсулину, измеряемому по связыванию $^{125}$I-инсулина. Более глубокий гидролиз трипсином приводит к полной потере как связывания, так и биологической чувствительности [10].

При действии на жировые клетки нейраминидазы в очень мягких условиях наблюдается увеличение базальной скорости окисления глюкозы [20, 21]. Более сильное действие фермента вызывает в какой-то степени избирательную потерю чувствительности к инсулину, почти не оказывая влияния на систему транспорта глюкозы, на липолитическое действие различных гормонов или на связывание $^{125}$I-инсулина. Таким образом, расщепление нейраминидазой, по-видимому, приводит к разобщению процессов связывания инсулина с рецептором и биологических эффектов гормона (транспорта глюкозы и липолитического действия) без существенной модификации какой-либо из этих систем. Подобное разобщение свидетельствует о том, что остатки сиаловой кислоты являются составным элементом структуры рецептора, не участвующим непосредственно в связывании с инсулином, но необходимым для передачи принятого сигнала от рецептора к соседним структурам.

Дополнительные доказательства того, что сиаловая кислота является компонентом рецептора инсулина, получены в опытах с β-галактозидазой [22]. Обработка этим ферментом в мягких усло-

виях сама по себе не оказывает никакого влияния ни на связывание инсулина, ни на чувствительность к нему. Однако, если жировые клетки подвергнуть действию β-галактозидазы одновременно с нейраминидазой или после предварительного расщепления последней, наблюдается значительное снижение как связывания инсулина, так и чувствительности к нему [22].

Гликопротеидная природа рецептора инсулина была также подтверждена при изучении взаимодействия этого рецептора с лектинами растений [23]. Агглютинин из зародышей пшеницы в низких концентрациях повышает связывающую активность рецептора посредством увеличения его сродства к инсулину. Этот агглютинин в высоких концентрациях или конканавалин А действуют как конкурентные ингибиторы связывания инсулина. Однако указанные воздействия лектинов не наблюдаются в присутствии специфичных для них сахаров. Эти данные свидетельствуют о том, что лектин изменяет связывание инсулина за счет взаимодействия со специфическим углеводным компонентом рецептора, а не посредством неспецифических гидрофобных или белок-белковых взаимодействий.

Изолированные жировые клетки после обработки фосфолипазой теряют чувствительность к инсулину [24]. Однако тот факт, что под действием фосфолипазы С или А (но не D) в мембранах жировых клеток и мембранах печени происходит 3—6-кратное увеличение связывания инсулина [24], свидетельствует о выявлении новых связывающих мест, неотличимых по кинетике от тех, которые обычно присутствуют в мембране. Обработка трипсином, предшествующая расщеплению фосфолипазой, вызывает разрушение только тех рецепторов, которые обычно могут связывать инсулин. Следовательно, с помощью фосфолипазы удается выявить «скрытые» связывающие места, которые обычно не доступны для растворимых макромолекул. После обработки фосфолипазой рецептор инсулина приобретает исключительную чувствительность к трипсину. Аналогичный эффект наблюдается и после экстракции липидов органическими растворителями. Добавление фосфолипидов к мембранам, предварительно обработанным фосфолипазой, приводит к частичной обратимости воздействия фосфолипазы на связывание инсулина.

Результаты исследований, проведенных с использованием ферментов, позволяют предположить, что рецептор инсулина является гликопротеидом. Возможно, он не содержит фосфолипидов, но непосредственно связан с ними.

### Д. Аномальное связывание инсулина

Если насыщаемое связывание инсулина измерять в широких пределах концентрации гормона, то кривые Скэтчарда при концентрациях инсулина, превышающих физиологический предел, будут вогнутыми [25—29]. Для объяснения этого выдвинуто предположе-

ние о существовании рецептора, обладающего низким сродством и высокой емкостью, в дополнение к уже описанному типу рецептора. Как подчеркивалось ранее, не все структуры, связывающие инсулин, являются рецепторами. Для предполагаемых инсулинсвязывающих мест, обладающих низким сродством, корреляции между связыванием и биологической активностью нет; не обнаружена также специфичность в отношении других гормонов — аналогов инсулина и т. д. На основании этих данных можно считать, что такие связывающие места с низким сродством по определению, принятому нами во введении, не являются истинными рецепторами.

Другой механизм, предложенный для объяснения нелинейности кривой Скэтчарда, включает эффект отрицательной кооперативности, проявляемый рецептором инсулина при его связывании с гормоном [29]. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что $^{125}I$-инсулин освобождается из мембран гораздо быстрее в присутствии возрастающих концентраций нативного инсулина. Ускоренное освобождение наблюдается даже в том случае, когда не происходит реассоциации $^{125}I$-инсулина. Эта гипотеза представляется особенно привлекательной, поскольку она предусматривает расширение диапазона концентраций инсулина, при которых возможна эффективная модуляция биологической активности. Однако некоторые факты трудно согласовать с наличием у рассматриваемого рецептора свойств отрицательной кооперативности. Так, дезаланиндезаспарагининсулин и дезоктапептидинсулин хотя и конкурируют с нативным гормоном за связывание с рецептором и проявляют биологическую активность, тем не менее не вызывают увеличения скорости диссоциации связанного с мембранами инсулина [29]. Более того, в присутствии нативного инсулина увеличивается также скорость освобождения $^{125}I$-инсулина из явно нерецепторного материала, например талька [4]. Известно, что инсулин образует димеры. Скорее всего наблюдаемая в нерецепторных системах кажущаяся «отрицательная кооперативность» обусловлена инсулин-инсулиновыми взаимодействиями. По-видимому, эффект отрицательной кооперативности, наблюдаемый в мембранных системах, имеет ту же природу. Учитывая то, что данные противоположного характера отсутствуют, указанные эффекты инсулина следует рассматривать как следствие самоагрегации молекул гормона. Это объяснение является простым и полностью согласуется с имеющимися в настоящее время экспериментальными фактами.

## III. РАСТВОРИМЫЙ РЕЦЕПТОР ИНСУЛИНА

### А. Экстракция детергентами

Обработка мембран печени или жировых клеток неионными детергентами, например тритоном Х-100 (1—2% по объему в зависимости от концентрации мембран), приводит к потере специфиче-

ской инсулинсвязывающей активности в осадке [30]; эту активность можно количественно обнаружить в надосадочной жидкости. Поскольку связывающая активность сохраняется в надосадочной жидкости после центрифугирования при 300 000 $g$ в течение 6 ч и включается в гранулы сефадекса G-200, можно считать, что получаемый препарат удовлетворяет критериям, обычно предъявляемым к солюбилизированным препаратам. Однако при уменьшении концентрации тритона Х-100 в экстракте до 0,05% и ниже путем разбавления или с помощью диализа против буфера, не содержащего детергента, солюбилизированная инсулинсвязывающая активность в основном обнаруживается в осадке.

Другой неионный детергент, луброл РХ, так же как и тритон Х-100, позволяет эффективно экстрагировать инсулинсвязывающую активность из мембран печеночных и жировых клеток. Однако то, что луброл РХ мешает образованию или определению инсулин-рецепторного комплекса, ограничивает использование этого детергента для экстракции рецепторов. С помощью дииодсалицилата лития удается проэкстрагировать лишь 40% инсулинсвязывающей активности мембран печеночных и жировых клеток. Безуспешными оказались попытки солюбилизировать рецептор инсулина с помощью ДСН, диметилсульфоксида, диметилформамида, гексафторизопропанола и пиридина.

Для получения растворимых инсулин-рецепторных комплексов разработан простой метод, основанный на дифференциальном осаждении комплекса $^{125}$I-инсулина с растворимым рецептором с помощью полиэтиленгликоля (карбовакс 6000) в присутствии γ-глобулина в качестве носителя [30]. Этот метод значительно облегчает изучение растворимого рецептора инсулина.

## Б. Свойства растворимого рецептора инсулина

Как подчеркивалось ранее, не все вещества, связывающие инсулин, являются рецепторами инсулина. Биологическую чувствительность к гормону в солюбилизированных препаратах определить уже нельзя, но, используя современные способы выявления ответов на инсулин, можно определить, принадлежит ли солюбилизированная инсулинсвязывающая активность рецептору инсулина. Установлено, что солюбилизированная инсулинсвязывающая активность почти идентична соответствующей активности мембран жировых клеток и клеток печени в отношении общего числа рецепторов, их сродства, кинетических параметров и специфичности связывания инсулина, конформационных изменений аденилатциклазы, а также в отношении взаимодействия с лектинами растений. Эти данные служат косвенным доказательством того, что солюбилизированная инсулинсвязывающая активность действительно принадлежит рецептору инсулина.

*1. Число солюбилизированных связывающих мест.* После экстракции мембран печени растворами тритона X-100 в возрастающих концентрациях обнаруживается хорошая корреляция между потерей инсулинсвязывающей активности в обработанных мембранах и появлением в растворимой фракции материала, связывающего инсулин [30]. Общая инсулинсвязывающая активность в экстракте оказывается выше, чем подобная активность, первоначально обнаруживаемая в интактной мембране. Это хорошо согласуется с наличием скрытых (маскированных) инсулинсвязывающих мест, которые могут быть выявлены после разрушения фосфолипидов. Экстракция мембран, предварительно обработанных фосфолипазой, позволяет получить количественный выход инсулинсвязывающей активности. Никакого увеличения этой активности в экстракте по сравнению с подобной активностью, обнаруживаемой в интактных мембранах, в данном случае не наблюдается.

*2. Сродство и кинетика связывания инсулина.* Процесс связывания инсулина с солюбилизированным рецептором мембран печеночных и жировых клеток является насыщаемым, обратимым, зависимым от времени и температуры [30,31]. Ассоциация инсулина с рецептором относится к реакциям второго порядка с $k_1 = 2{,}3 \cdot 10^{-6}$ $моль^{-1} \cdot с^{-1}$ при 24° С, а диссоциация этого комплекса — к реакциям первого порядка с $k_{-1} = 3{,}8 \cdot 10^{-4}$ $с^{-1}$. Константа диссоциации, рассчитанная на основании кинетических данных, равна $1{,}6 \cdot 10^{-10}$ М. График Скэтчарда для равновесного связывания $^{125}I$-инсулина с солюбилизированным белком мембран печени является прямой линией, что свидетельствует о гомогенности определяемых инсулин-рецепторных мест и об отсутствии заметной кооперативности [30]. Значение равновесной константы диссоциации ($1{,}3 \cdot 10^{-10}$ М), рассчитанное на основании графика Скэтчарда, хорошо совпадает со значением, вычисленным по данным кинетических экспериментов, и достаточно хорошо согласуется с подобной величиной, полученной для рецептора, связанного с мембраной.

*3. Специфичность солюбилизированного рецептора.* Нативный инсулин и некоторые его производные могут блокировать связывание $^{125}I$-инсулина с солюбилизированными рецепторами. Эта особенность, присущая производным инсулина и другим пептидам, коррелирует со способностью указанных соединений блокировать соединение $^{125}I$-инсулина с рецептором, связанным с мембраной.

*4. Химическая природа солюбилизированного рецептора.* Солюбилизированный рецептор инсулина, по-видимому, является гликопротеидом. Обычно используемые для денатурации белков такие агенты, как ДСН, мочевина и гуанидин, вызывают заметное уменьшение инсулинсвязывающей активности. Эта потеря активности может быть до некоторой степени восстановлена путем простого разведения денатурирующего агента. Однако продолжительная инкубация с упомянутыми денатурирующими агентами приводит к необратимой инактивации рецептора [31].

Ферменты сходным образом модифицируют солюбилизированный рецептор и рецептор, связанный с мембранами, если фосфолипидное окружение последнего изменено в результате предварительного действия фосфолипазы. Солюбилизированный рецептор инсулина разрушается под действием трипсина в очень мягких условиях (0,5 мкг/мл при 37° С в течение 20 мин) [31]. Эти условия являются слишком мягкими, чтобы вызвать модификацию рецептора инсулина в интактных клетках печени и жировых клетках. Однако в подобных условиях рецептор, связанный с мембраной, также разрушается, если мембраны предварительно обработать фосфолипазой. Обработка фосфолипазой не изменяет инсулинсвязывающих свойств солюбилизированного рецептора [31] и не приводит к выявлению «скрытых» рецепторов. Показано также, что нейраминидаза не влияет на связывающую активность солюбилизированного рецептора [31].

Агглютинин из зародышей пшеницы и конканавалин А оказывают идентичное влияние на связывание инсулина как с солюбилизированными рецепторами, так и с рецепторами, связанными с мембраной [32]. Эти данные свидетельствуют о взаимодействии указанных белков с углеводным компонентом рецептора, а не с прилегающими к последнему участками поверхности мембраны.

*5. Размер солюбилизированного рецептора.* Размер молекул солюбилизированного рецептора определен с помощью гель-фильтрации и центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [31]. Молекула этого рецептора в высокой степени асимметрична. Ее радиус Стокса равен 70 Å, а мол. вес солюбилизированного рецептора равен 300 000. Определение указанных параметров не зависит от концентрации детергента при условии, что последний присутствует в минимальной концентрации, необходимой для предотвращения агрегации молекул рецептора. Обработка мембран фосфолипазой, предшествующая экстракции рецептора инсулина, не изменяет свойств этого рецептора в отношении его поведения при гель-фильтрации или центрифугировании в градиенте плотности сахарозы. Таким образом, маловероятно, чтобы рецептор содержал липидный компонент. Тот факт, что рецептор инсулина седиментирует в растворах хлористого цезия при плотности выше чем 1,298, также противоречит представлению о липопротеидной природе этого рецептора.

## В. Очистка рецептора инсулина

Поскольку рецептор инсулина содержится в тканях в чрезвычайно малых количествах, его очистка является трудной задачей. Например, рецептор инсулина составляет лишь $2\cdot10^{-4}$% общего белка, содержащегося в гомогенате печени, и около $4\cdot10^{-3}$% белка мембран. Всего 0,2 мг рецепторного белка присутствует в гомогенате печени 40 крыс, содержащем около 90 г белка. Таким образом,

для получения чистого рецептора инсулина необходима очистка в 400 000 раз, тогда как для выделения в гомогенном виде рецептора ацетилхолина из электрической ткани угря достаточно провести очистку лишь в 300—1000 раз.

*1. Инсулин-агарозные аффинные адсорбенты.* Используя для очистки рецепторов обычные методы белковой химии, такие, как фракционирование сульфатом аммония и хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, можно добиться лишь небольшой степени очистки [33]. Значительные успехи в очистке рецепторов были достигнуты с помощью аффинной хроматографии. Для приготовления аффинных адсорбентов инсулин непосредственно или, еще лучше, через «мостик» ковалентно присоединяют к активированной цианогенбромидом агарозе. При пропускании через колонку с этими адсорбентами экстрагированного тритоном Х-100 рецептора инсулина на колонке удерживается от 20 до 90% связывающей активности, которую можно элюировать раствором 4,5 *М* мочевины рН 6,5. Метод позволяет получать 50—80% удержанного на колонке рецептора, очищая его в 8000 раз. Если же к рецептору добавить инсулин перед нанесением на колонку или если рецептор пропустить через колонку с незамещенной агарозой, удерживания связывающей активности не наблюдается [33].

К сожалению, попытки очистить рецептор инсулина с помощью аффинной хроматографии в препаративных масштабах не увенчались успехом. Емкость названных аффинных адсорбентов оказалась меньше, чем можно было бы предположить, исходя из того количества лиганда, которое содержат эти адсорбенты. Уменьшение емкости адсорбентов, возможно, обусловлено пропусканием через колонки больших количеств неочищенного белка. При нанесении на колонку частично очищенного рецептора степень очистки значительно повышается.

*2. Лектин-агарозные аффинные адсорбенты.* Способность агглютинина из зародышей пшеницы и конкавалина А связываться с высоким сродством с рецептором инсулина позволяет использовать эти белки в качестве лигандов для очистки рецепторов инсулина с помощью аффинной хроматографии [32]. При пропускании тритоновых экстрактов рецептора через колонку с агарозой, к которой ковалентно присоединены лектины, удерживается 60—80% инсулинсвязывающей активности этих экстрактов. Адсорбированный материал удается затем легко элюировать раствором соответствующего простого сахара. Поскольку рецептор инсулина составляет лишь небольшой процент общего количества гликопротеидов мембран клеток печени или жировых клеток, логично предположить, что с помощью упомянутых адсорбентов можно добиться только невысокой степени очистки. Однако, поскольку тритон при 0,2%-ной концентрации в используемых при хроматографии буферах не оказывает влияния на связывание рецептора инсулина с лектинами и в то же время в значительной степени препятствует связыванию

многих других гликопротеидов мембран, возможна очистка препарата рецепторов в 3000 раз. Простой и специфичный способ элюирования рецепторного белка, относительно высокая емкость адсорбента, а также быстрое отщепление рецептора от лиганда в присутствии соответствующего сахара — эти преимущества данных адсорбентов по сравнению с инсулин-агарозными значительно упрощают процедуру очистки.

## IV. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ИНСУЛИНА

Один из самых интересных и важных аспектов проблемы рецептора инсулина — установление точного механизма, посредством которого образовавшийся инсулин-рецепторный комплекс влияет на специфические биологические функции клетки-мишени.

Большинство эффектов инсулина, например влияние на липолиз, синтез гликогена и обмен белков, противоположно эффектам циклического АМФ (цАМФ). Опосредуемое цАМФ фосфорилирование специфического мембранного белка, осуществляемое под действием эндогенной протеинкиназы, вызывает угнетение стимулируемого инсулином транспорта глюкозы [34, 35]. Фосфорилирующая система в инсулинрезистентных жировых клетках морских свинок или крыс, которых кормили сахарозой, оказывается в какой-то степени поврежденной. В тканях-мишенях, обработанных гормонами, повышающими внутриклеточный уровень цАМФ, инсулин снижает этот уровень [27—41]. Сообщалось, что инсулин в физиологических концентрациях уменьшает активность аденилатциклазы мембран, выделенных из жировых клеток и клеток печени [42—44]. Таким образом, первичное действие инсулин-рецепторного комплекса можно было бы отнести к снижению активности аденилатциклазы, а все другие эффекты связать со снижением внутриклеточного содержания цАМФ.

Некоторые наблюдения довольно трудно согласовать с этой унитарной гипотезой. Инсулин индуцирует синтез определенных белков, стимулируемый также цАМФ и гормонами, увеличивающими уровень данного нуклеотида [45]. Инсулин в концентрациях, превышающих физиологические, проявляет свое действие в НТС-клетках, не содержащих измеряемых количеств цАМФ [46]. Гормон подавляет действие экзогенного цАМФ [47], увеличивает внутриклеточное содержание циклического ГМФ (цГМФ) [48] и стимулирует специфическую связанную с мембранами фосфодиэстеразу [49]. Показано, что ни один из этих эффектов не является результатом снижения уровня цАМФ.

Возможно, первичное действие рецептора инсулина связано с образованием какого-то неизвестного фактора, действие которого в свою очередь приводит как к уменьшению образования цАМФ, так и к изменению активности различных ферментов. Согласно альтернативной гипотезе [50, 51], свободный рецептор инсулина не

связан непосредственно с другими макромолекулами мембран. Но после образования комплекса с инсулином рецептор приобретает сродство к другим структурам мембран, например к аденилатциклазе, компонентам системы транспорта глюкозы и, возможно, к связанной с мембранами фосфодиэстеразе или гуанилатциклазе. Пред-

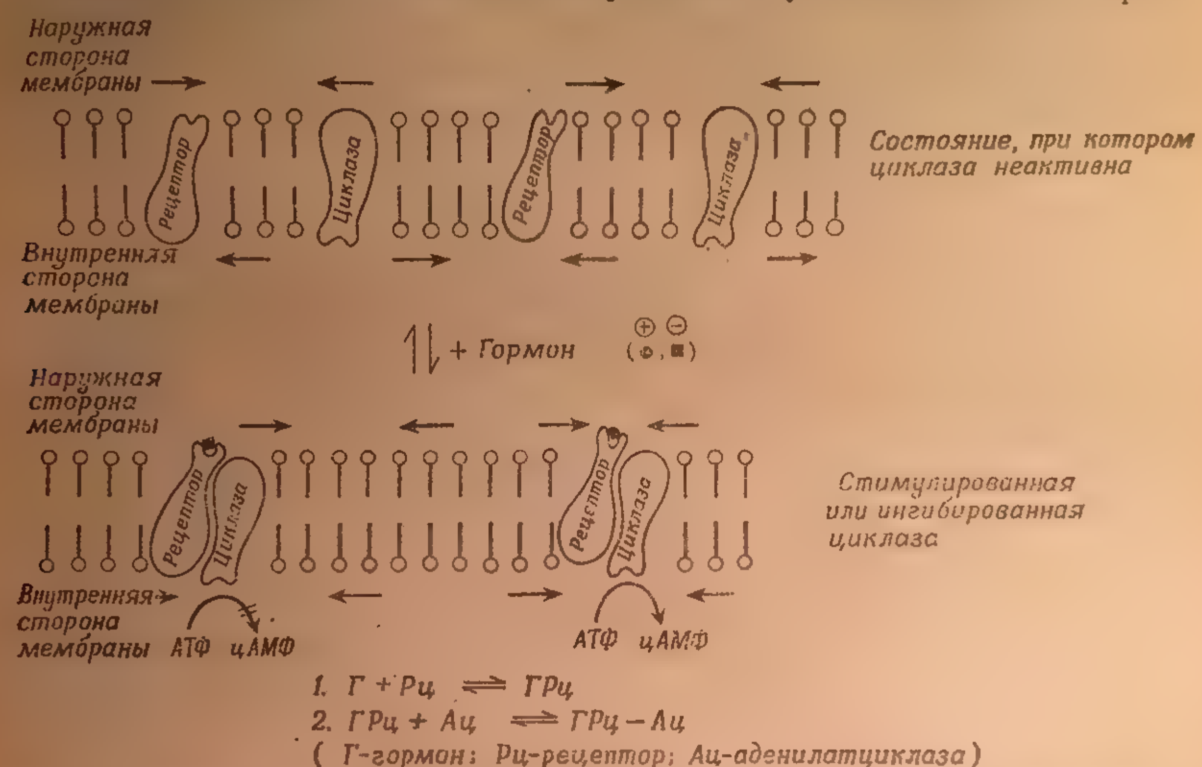



**Рис. 1.** Гипотетическая схема двухступенчатого механизма гормональной модуляции активности аденилатциклазы, локализованной в полужидких клеточных мембранах. Гипотеза основана на том, что рецепторы и фермент являются отдельными структурами, которые приобретают специфичность и сродство для образования комплекса только после того, как рецептор будет занят гормоном. Эти структуры могут соединяться друг с другом после связывания гормона благодаря тому, что клеточные мембраны находятся в полужидком состоянии. Связывающие гормон участки рецептора расположены на наружной поверхности мембраны, обращенной в водную среду, а каталитический участок фермента находится на внутренней поверхности клеточной мембраны, обращенной к цитоплазме.

полагается, что рецептор инсулина должен свободно диффундировать в плоскости мембраны. Это положение полностью удовлетворяет требованиям получившей наибольшее признание жидкостно-мозаичной модели биологических мембран. Остается объяснить, каким образом инсулин, взаимодействуя с единственным гомогенным рецептором, может вызывать в мембранах особые и, вероятно, независимо протекающие процессы (рис. 1).

## V. РЕЦЕПТОР ИНСУЛИНА ПРИ АНОМАЛИЯХ МЕТАБОЛИЗМА

При некоторых инсулинрезистентных состояниях изменения, затрагивающие рецептор инсулина, уже охарактеризованы. В то вре-

мя как изменение сродства связывания инсулина при этих состояниях свидетельствует об аномальности рецептора, об изменении числа рецепторов сделать какое-либо заключение довольно трудно. В гетерогенной популяции клеток изменение среднего числа рецепторов на клетку скорее отражает изменение состава популяции, а не изменение числа рецепторов на клетку каждого типа. Это замечание особенно важно учитывать при изучении периферических мононуклеарных лейкоцитов, поскольку рецепторами обладает лишь небольшая субпопуляция клеток (макрофаги и трансформированные лимфоциты) [52, 53]; то же самое относится и к клеткам печени. Препараты плазматических мембран могут быть в различной степени загрязнены внутриклеточными мембранами, и белковый состав плазматических мембран может в значительной степени варьировать при различных метаболических состояниях. Следовательно, связывание инсулина фракциями частиц, выражаемое количеством связанного инсулина на 1 мг белка, может приводить к ошибочному определению плотности рецептора инсулина.

С учетом вышеприведенных замечаний рассмотрим работы, относящиеся к изучению рецептора инсулина при инсулинрезистентных состояниях. При различных метаболических состояниях сродство рецептора инсулина остается неизменным. Нормальным сохраняется и число рецепторов в инсулинрезистентных жировых клетках тучных людей [54], крыс с ожирением [55], голодающих крыс, а также крыс, обработанных глюкокортикоидами, и крыс с диабетом, вызванным стрептозотоцином [56]. Вместе с тем в лимфоцитах тучных людей [57], в мембранах печеночных клеток мышей с ожирением, вызванным тиоглюкозой [58], и мышей с имплантированной опухолью гипофиза, секретирующей гормон роста, пролактин и АКТГ [59], а также в тимоцитах, мембранах печеночных, жировых и почечных клеток мышей (ob/ob и db/db) с ожирением, вызванным гипергликемией [60—64], концентрация рецепторов инсулина уменьшается. В последнем случае уменьшение числа рецепторов инсулина не может быть строго специфичным процессом, а скорее всего является частью общего повреждения гликопротеидов мембран [64]. Принимая во внимание наличие сверхчувствительной системы равновесия между инсулином и глюкагоном в регуляции метаболических процессов, чрезвычайно важно отметить тот факт, что при уменьшении связывания инсулина у мышей с гипергликемическим ожирением [61, 62, 64] и у мышей с имплантированной опухолью гипофиза [59] уровень связывания глюкагона не меняется.

Показано, что выдерживание клеток-мишеней in vitro в среде, содержащей инсулин в высоких концентрациях, приводит к потере рецепторов инсулина [65]. Однако этот эффект не обусловлен специфическим взаимодействием инсулина с его рецептором [66] и усиливается при увеличении концентраций инсулина, на несколько порядков превышающих концентрации, необходимые для насыще-

ния рецепторов. Его действие наблюдается и с производными инсулина, которые не связываются с рецепторами инсулина, а также в метаболически инертных клетках. Кроме того, инсулин в высоких концентрациях уменьшает in vitro число рецепторов агглютинина из зародышей пшеницы и конканавалина A, а также глюкагона. Эти эффекты инсулина, по-видимому, являются результатом присущей данному гормону протеолитической активности, и пока еще не ясно, играют ли они физиологическую или патогенетическую роль.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. *Cuatrecasas P.*, Fed. Proc., *32*, 1838 (1973).
2. *Hollenberg M. D., Cuatrecasas P.*, in: Methods in Receptor Research (M. Blecher, ed.), Marcel Dekker, New York, 1975.
3. *Roth J.*, Metabolism, *22*, 1059 (1975).
4. *Cuatrecasas P., Hollenberg M. D.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *62*, 31 (1975).
5. *Freychet P., Roth J., Neville D. M.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *68*, 1833 (1971).
6. *Cuatrecasas P.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *68*, 1264 (1971).
7. *Chang K.-J., Bennett V., Cuatrecasas P.*, J. Biol. Chem., *250*, 488 (1975).
8. *Cuatrecasas P.*, J. Biol. Chem., *246*, 7265 (1971).
9. *Cuatrecasas P., Desbuquois B., Krug F.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *44*, 333 (1971).
10. *Hintz R. L., Clemmons D. R., Underwood L. E., Van Wyk J. J.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 2351 (1972).
11. *Megyesi K., Kahn C. R., Roth J., Froesch E. R., Humbel R. E., Zapf J., Neville D. M., Jr.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *57*, 307 (1974).
12. *Kono T.*, J. Biol. Chem., *244*, 5777 (1969).
13. *Cuatrecasas P.* J. Biol. Chem. *246*, 6522 (1971).
14. *Cuatrecasas P.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *63*, 450 (1969).
15. *Turkington R. W.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *41*, 1362 (1970).
16. *Oka T., Topper Y. J.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *68*, 2066 (1971).
17. *Oka T., Topper Y. J.*, Nature, New Biol., *239*, 216 (1972).
18. *Blatt L. M., Kim K. H.*, J. Biol. Chem. *241*, 4895 (1971).
19. *Bennett V., Cuatrecasas P.*, Biochim. Biophys. Acta, *311*, 362 (1973).
20. *Cuatrecasas P., Illiano G.*, J. Biol. Chem., *246*, 4938 (1971).
21. *Rosenthal J. W., Fain J. N.*, J. Biol. Chem., *246*, 5888 (1971).
22. *Cuatrecasas P.*, in: Insulin Action (I. B. Fritz, ed.), Academic Press, London, New York, 1972, pp. 137—169.
23. *Cuatrecasas P.*, J. Biol. Chem., *248*, 3528 (1973).
24. *Cuatrecasas P.*, J. Biol. Chem., *246*, 6532 (1971).
25. *Freychet P., Laudat M. H., Laudat P., Rosselin G., Kahn C. R., Gorden P., Roth J.*, Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett., *25*, 339 (1972).
26. *Hammond J. M., Jarett L., Mariz J. K., Daughaday W. H.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *49*, 1122 (1972).
27. *Gavin J. R., Gorden P., Roth J., Archer J. A., Buell D. N.*, J. Biol. Chem., *248*, 2202 (1973).
28. *Kahn C. R., Freychet P., Roth J., Neville D. M.*, J. Biol. Chem., *249*, 2249 (1974).
29. *DeMeyts P., Roth J., Neville D. M., Gavin J. R., Lesniak M. A.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *55*, 154 (1973).
30. *Cuatrecasas P.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 318 (1972).
31. *Cuatrecasas P.*, J. Biol. Chem., *247*, 1980 (1972).
32. *Cuatrecasas P., Tell G. P. E.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *70*, 485 (1973).
33. *Cuatrecasas P.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 1277 (1972).
34. *Chang K.-J., Cuatrecasas P.*. J.Biol. Chem. **249**, 3170 (1974).
35. *Chang K.-J., Marcus N. A., Cuatrecasas P.*, J. Biol. Chem., *249*, 6854 (1974).

36. *Butcher R. W., Sneyd J. G. T., Park C. R., Sutherland E. W.*, J. Biol. Chem., *241*, 1651 (1966).
37. *Butcher R. W., Baird C. E., Sutherland E. W.*, J. Biol. Chem., *243*, 1705 (1968).
38. *Jungas R. L.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *56*, 757 (1966).
39. *Manganiello V. C., Murad F., Vaughan M.*, J. Biol. Chem., *246*, 2195 (1971).
40. *Jefferson L. S., Exton J. H., Butcher R. W., Sutherland C. W., Park C. R.*, J. Biol. Chem. *243*, 1031 (1968).
41. *Exton J. H., Lewis S. B., Ho R. H., Robinson G. A., Park C. R.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., 185, 85 (1971).
42. *Ray T. K., Tomasi V., Marinetti G. V.*, Biochim. Biophys. Acta, **211**, 20 (1970).
43. *Hepp K. D.*, FEBS Lett., *12*, 263 (1971).
44. *Illiano G., Cuatrecasas P.*, Science, *175*, 906 (1972).
45. *Wicks W. D.*, J. Biol. Chem., *244*, 3941 (1969).
46. *Gelehter T. D., Tomkins G. M.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *66*, 390 (1970).
47. *Glinsman W. H., Mortimore G. E.*, Am. J. Physiol., *215*, 553 (1968).
48. *Illiano G., Tell G. P. E., Siegel M. I., Cuatrecasas P.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *70*, 2443 (1973).
49. *Thompson W. J., Little S. A., Williams R. H.*, Biochemistry, *12*, 1889 (1973).
50. *Cuatrecasas P.*, Ann. Rev. Biochem., *43*, 169 (1974).
51. *Bennett V., O'Keefe E., Cuatrecasas P.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *72*, 33 (1975).
52. *Krug U., Krug F., Cuatrecasas P.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 2604 (1972).
53. *Schwartz R. H., Bianco A. R., Handwerger B. S., Kahn C. R.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *72*, 474 (1975).
54. *Amatruda J. A., Livingston J. N., Lockwood D. H.*, Science, *188*, 264 (1975).
55. *Livingston J. N., Cuatrecasas P., Lockwood D. H.*, Science, *177*, 626 (1972).
56. *Bennett G. V., Cuatrecasas P.*, Science, *176*, 805 (1972).
57. *Archer J. A., Gorden P., Gavin J. R., Lesniak M. A., Roth J.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *36*, 627 (1973).
58. *Kahn C. R., Soll A., Neville D. M., Roth J.*, Clin. Res., *21*, 628 (1973).
59. *Goldfine I. D., Kahn C. R., Neville D. M., Roth J., Garrison M. M., Bates R. W.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., *53*, 852 (1973).
60. *Freychet P., Laudat M. H., Laudat P., Rosselin G., Kahn C. R., Gorden P., Roth J.* Fed. Eur. Biol. Soc. Lett., *25*, 339 (1972).
61. *Kahn C. R., Neville D. M., Gorden P., Freychet P., Roth J.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *48*, 135 (1972).
62. *Kahn C. R., Neville D. M., Roth J.*, J. Biol. Chem., *248*, 244—250 (1973).
63. *Soll A. H., Goldfine I. D., Roth J., Kahn C. R., Neville D. M.*, J. Biol. Chem., *249*, 4127.
64. *Chang K.-J., Huang D., Cuatrecasas P.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *64*, 566 (1975).
65. *Gavin J. R., Roth J., Neville D. M., DeMeyts P., Buell D. N.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *71*, 84 (1974).
66. *Huang D., Cuatrecasas P.*, J. Biol. Chem., *250*, 825 (1975).

# Глава 3

# РЕЦЕПТОРЫ ГЛЮКАГОНА В МИОКАРДЕ

*И. КЛЕЙН*[1] *И ДЖ. ЛЕВИ*[2]

Division of Endocrinology and Metabolism
Department of Medicine, University of Miami School of Medicine
Miami, Florida

## I. ВВЕДЕНИЕ

Роль гормонов в изменении метаболизма клеток соответствующих органов-мишеней хорошо известна. Первым этапом гормонального действия является, по-видимому, связывание со специфическими рецепторами, находящимися на поверхности клетки [1, 2]. Такое связывание продемонстрировано для ряда гормонов в различных тканях [2—5]. Показано, что благодаря активации аденилатциклазы изменяется скорость синтеза цАМФ, который модулирует внутриклеточное действие определенных гормонов в различных тканях [6]. Поэтому процесс связывания с рецептором должен быть каким-то образом сопряжен с изменениями активности этого фермента, обусловливая тем самым специфичность на клеточном уровне. Согласно предположению Сазерлэнда и др. [7], рецептор и фермент являются отдельными частями общей молекулы, содержащей участки, ответственные как за специфическое связывание с гормоном, так и за каталитическую активность. Данные, полученные в экспериментах с различными тканями, показали, что связывание и активация представляют собой отдельные процессы, которые могут быть разобщены [8, 9]. Это позволяет предположить, что рецепторная и каталитическая функции связаны с различными субъединицами молекулы. Для понимания функционирования гормонов на клеточном уровне необходимо выяснить точный механизм, посредством которого связывание гормонов со специфическими рецепторами приводит к изменению активности фермента.

В общем предполагают, что связанный рецептор оказывает стимулирующее, или позитивное влияние на каталитическую субъединицу либо непосредственно, либо через сопрягающий фактор. Это предположение лежит в основе современной модели взаимодействия рецептора с аденилатциклазой, схематически показанной на рис. 1

---

[1] Настоящий адрес: Laboratory of Molecular Biology National Cancer Institute, National Institute of Health, Bethesda, Maryland.
[2] Investigator, Howard Hughes Medical Institute.

[10]. Она была предложена Родбеллом и др. [4] для активации глюкагона в ткани печени. Регуляторная субъединица (рецептор), расположенная на наружной стороне плазматической мембраны, ответственна за стереоспецифическое связывание и отлична от других субъединиц. Полагают, что сопрягающий фактор является липидом или фосфолипидом [4, 11, 12], а каталитическая субъединица представляет собой стимулируемую фтором аденилатциклазу. В дальнейшем под аденилатциклазной системой будет подразуме-




**Рис. 1.** Модель индуцируемых гормоном изменений активности аденилатциклазы. (Перепечатано с разрешения издательства Academic Press [25].)

ваться рассмотренная выше многокомпонентная модель, тогда как аденилатциклазой будет именоваться каталитическая субъединица. Особая природа связи с мембранами, присущая аденилатциклазным системам большинства млекопитающих, в значительной степени осложняет исследования по связыванию гормонов в тканях и в частично очищенных препаратах мембран с целью выяснения функций отдельных субъединиц этой системы.

Точная молекулярная структура аденилатциклазной системы во многом еще неясна. До сих пор не удалось очистить этот фермент из-за его лабильности в условиях in vitro. В настоящее время проведена оценка молекулярного веса аденилатциклазы, выделенной из сердца [13, 14]. Выяснение природы взаимодействия между постулированными субъединицами молекулы будет способствовать более глубокому пониманию функционирования аденилатциклазной системы — этого сложного регуляторного механизма клетки.

Ранее была описана простая одностадийная методика солюбилизации аденилатциклазы миокарда кошки, основанная на ис-

гих субъединиц. Полагают, что сопрягающий фактор является липидом или фосфолипидом [4, 11, 12], а каталитическая субъединица представляет собой стимулируемую фтором аденилатциклазу. В дальнейшем под аденилатциклазной системой будет подразуме-

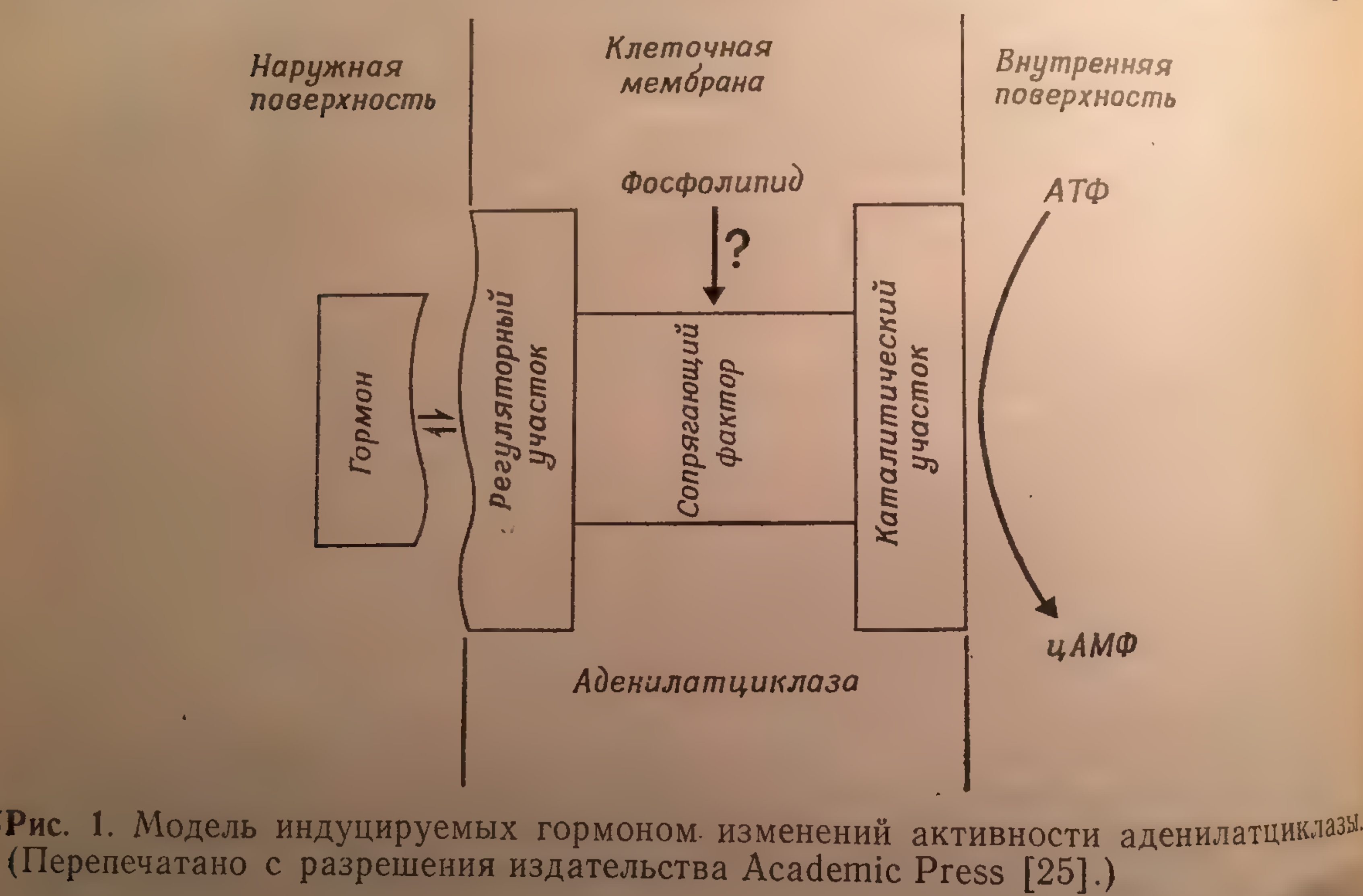



Рис. 1. Модель индуцируемых гормоном изменений активности аденилатциклазы. (Перепечатано с разрешения издательства Academic Press [25].)

ваться рассмотренная выше многокомпонентная модель, тогда как аденилатциклазой будет именоваться каталитическая субъединица. Особая природа связи с мембранами, присущая аденилатциклаз-

пользовании неионного детергента луброла РХ [13]. Пользуясь этой методикой из препарата, содержащего фермент, рецептор и другие компоненты, легко удаляют детергент, а затем определяют связывание с гормоном и каталитическую активность. Глюкагон относится к гормонам, которые, как установлено, оказывают инотропное и хронотропное действия на сердечную мышцу, опосредованные, по-видимому, через систему аденилатциклаза — цАМФ [15]. В данной главе мы опишем эксперименты, касающиеся связывания глюкагона с упомянутой выше солюбилизированной ферментной системой.

## II. МЕТОДЫ

Во всех опытах был использован миокард левого желудочка взрослых кошек. После удаления эндо- и эпикарда мышцы гомогенизировали в *трис*-HCl-буфере, содержащем ЭДТА и 20 мМ луброла РХ. Гомогенат центрифугировали при 12 000 g для получения надосадочной жидкости, свободной от внутриклеточных частиц [13]. Надосадочную жидкость наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, которую затем промывали *трис*-HCl-буфером для полного удаления детергента, после чего элюировали фермент и использовали его во всех последующих экспериментах. Содержание аденилатциклазы определяли по методу Кришны и др. [16]; иодированный глюкагон, используемый при изучении связывания, получали модифицированным методом Хантера и Гринвуда [17].

Для определения глюкагонсвязывающей активности фракции свободного и связанного гормона разделяли на небольших колонках с целлюлозой, которые промывали *трис*-буфером. Как было определено при сравнении с соответствующим контролем, использование таких колонок позволяет удалять более 90% свободного глюкагона. Дальнейшую очистку фракции связанного глюкагона проводили либо на колонках с сефадексом G-100 объемом 2,8 или 86 мл, либо с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия (ДСН).

Условия эксперимента и используемые концентрации гормона приведены в подписях к соответствующим рисункам. Для более подробного ознакомления с методическими вопросами можно рекомендовать работы [3, 18].

## III. РЕЗУЛЬТАТЫ

### А. Изучение связывания глюкагона

Биологическая активность меченого глюкагона была установлена по его способности активировать аденилатциклазу в препаратах частиц миокарда [3]. В эксперименте необходимо было показать наличие биологической активности у используемого солю-

билизированного фермента. Оказалось, что глюкагон в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М действительно активирует солюбилизированные препараты, но только при добавлении фосфатидилсерина. Это требование, установленное ранее для немеченого глюкагона в идентичных условиях инкубации, послужило основанием для предположения о роли фосфолипидов в активации солюбилизированной аденилатциклазы [11]. Кроме того, ранее нами было показано, что глюкагон связывается с солюбилизированной аденилатциклазой миокарда как в присутствии, так и в отсутствие луброла РХ [18]. Связывание наблюдается при концентрации глюкагона выше $1 \cdot 10^{-7}$ М, причем меченый гормон вытесняется немеченым в той же концентрации. В присутствии избытка немеченого глюкагона от 10 до 20% меченого гормона остается невытесненным; по-видимому, эта часть глюкагона связана неспецифически.

Дальнейшим подтверждением специфичности наблюдаемого связывания $^{125}$I-глюкагона послужило установление корреляции измеряемого количества связанного гормона со степенью активации фермента. Однако следует отметить, что связывание является линейной функцией времени и становится максимальным через 30 мин при 37° С, тогда как активация фермента достигает максимума через 5 мин. Расчеты, выполненные по кривой связывания, построенной в зависимости от времени, показывают, что через 5 мин оказываются занятыми только 15—20% общего количества глюкагонсвязывающих мест; остальная же часть связавшегося глюкагона, по-видимому, приходится на долю «резервных» рецепторов. С понижением температуры инкубации скорость связывания меченого глюкагона замедляется таким образом, что при 0° С максимум связывания достигается не ранее, чем через 120 мин.

Для изучения химической природы глюкагонсвязывающего материала были использованы предварительно обработанные различными ферментами солюбилизированные препараты мембран. Поскольку протеолитический фермент трипсин значительно уменьшает связывающую активность этих препаратов, можно предположить, что связывающий материал содержит белковую часть. Нейраминидаза, РНКаза, ДНКаза и фосфолипазы А и С не оказывают никакого влияния на связывание.

### Б. Данные о диссоциации глюкагонсвязывающих мест

Как показано на рис. 2, после пропускания через колонку с сефадексом G-100 объемом 2,8 мл солюбилизированного свободного от детергента препарата миокарда ферментативная активность появляется в довольно узкой зоне, соответствующей свободному объему колонки; глюкагонсвязывающая активность обнаруживается в той же зоне. Однако кривые распределения ферментативной активности и связывания не совпадают, причем последняя становится более пологой в направлении зоны низко-

молекулярных веществ, что, вероятно, отражает более высокую чувствительность метода определения связывания $^{125}$I-глюкагона по сравнению с методом определения ферментативной активности при низких уровнях связывания и активности соответственно. Размер колонки, используемой в этих экспериментах, также увеличивает вероятность небольших методических погрешностей, присущих колоночной хроматографии. Как показано на рис. 2, *Б*, предварительная инкубация солюбилизированного препарата миокарда с $^{125}$I-глюкагоном и последующая хроматография на сефадексе

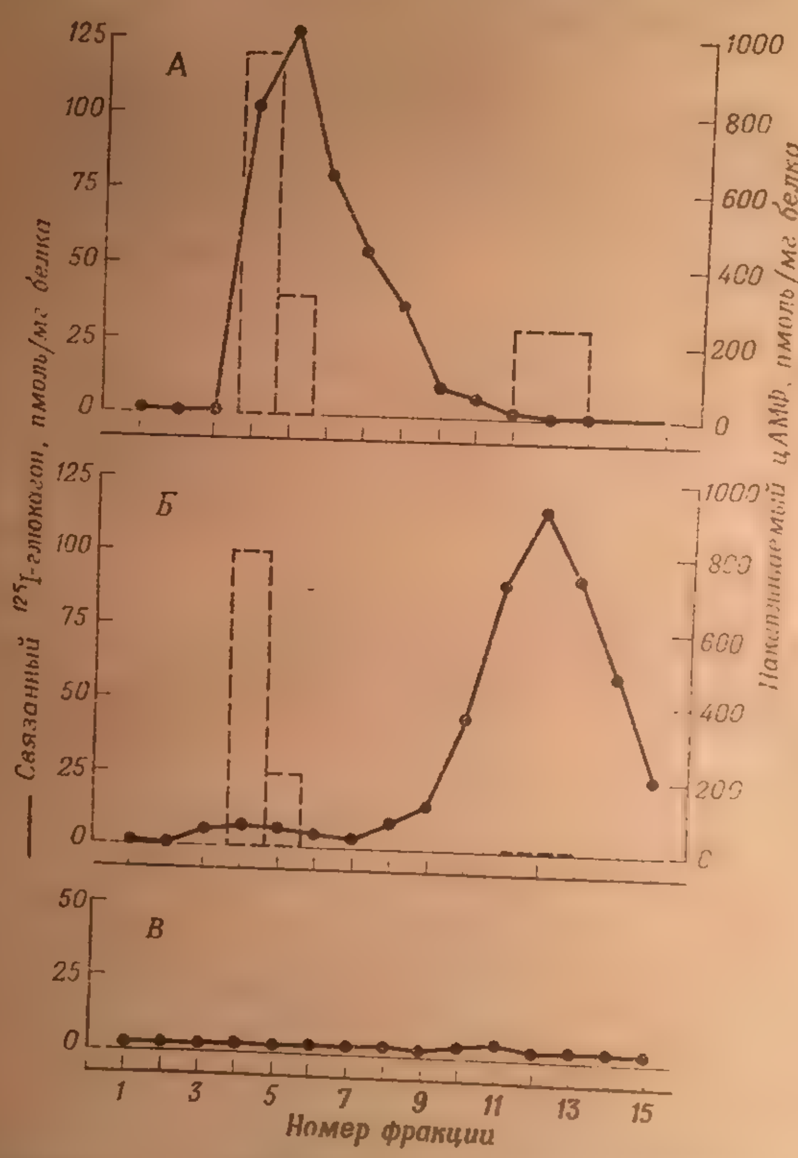



Рис. 2. Хроматография на сефадексе G-100 солюбилизированного препарата миокарда. Сплошная линия — связывание $^{125}$I-глюкагона, штриховая — активность аденилатциклазы. *А*. Связывание с глюкагоном проводили после хроматографического разделения солюбилизированного препарата миокарда, свободного от детергента. *Б*. Связывание глюкагона после предварительной инкубации солюбилизированного препарата миокарда с $^{125}$I-глюкагоном. *В*. Отсутствие связывания меченого глюкагона в хроматографируемых образцах при добавлении избытка немеченого гормона. (Перепечатано с разрешения American Society of Biological Chemists [3].)

приводят к количественному сдвигу глюкагонсвязывающей активности в низкомолекулярную область. В этих условиях форма кривой элюции активности аденилатциклазы не изменяется и вся активность по-прежнему обнаруживается в высокомолекулярной области, совпадающей со свободным объемом колонки. Связывания не происходит при внесении в инкубационную смесь перед добавлением меченого глюкагона немеченого гормона (рис. 2, *В*). В этом случае свободный гормон элюируется намного позднее, а пик связанного глюкагона составляет менее 10% соответствующего пика, показанного на рис. 2, *Б*.

Для более точного определения хроматографического поведения и природы диссоциируемой низкомолекулярной глюкагонсвязывающей фракции были использованы колонки с сефадексом G-100 и биогелем Р-30 большего размера, объемом до 86 мл. Как показано на рис. 3, *А*, глюкагонсвязывающая активность подвергаемого хроматографии солюбилизированного препарата располагается в зоне между выходом с колонки декстрана голубого (свободный объем) и альбумина. Это позволяет предположить, что молекулярный вес исследуемого препарата приблизительно равен молекулярному весу, ранее установленному для аденилатциклазы миокарда [13]. И в этом случае после преинкубации солюбилизированного препарата с меченым глюкагоном кривая элюции связывающего материала сдвигается в низкомолекулярную область (рис. 3, *Б*). Оценка результатов разделения показывает, что данная зона соответствует объему, в котором обычно элюируются соли; это свидетельствует о взаимодействии между связанным $^{125}$I-глюкагоном и сефадексом. Такое предположение подтверждается элюированием связывающего материала сильно щелочными растворами и наблюдающимся при этом сдвиге кривой элюции, как показано на рис. 3, *В*.

Глюкагонсвязывающий материал охарактеризован не только на основании хроматографического поведения, но и по подвижности при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии ДСН. Оба препарата глюкагонсвязывающего материала, как экстракт, получаемый с помощью хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой, так и часть элюата с сефадекса G-100, соответствующая наиболее низкомолекулярной фракции глюкагонсвязывающей активности, после инкубации их с $^{125}$I-глюкагоном мигрируют в зоне, четко отличающейся от зоны свободного $^{125}$I-глюкагона, и обнаруживают одинаковую электрофоретическую подвижность. Последний факт свидетельствует о том, что хроматография на сефадексе отражает разделение дискретных субъединиц молекулы, а не просто изменение глюкагонсвязывающих свойств солюбилизированного миокарда. Глюкагонсвязывающую активность не обнаруживали ранее в низкомолекулярной зоне из-за относительной близости этой зоны к зоне свободного $^{125}$I-глюкагона и из-за отсутствия ожидаемой активности в зоне, соответствующей предпо-

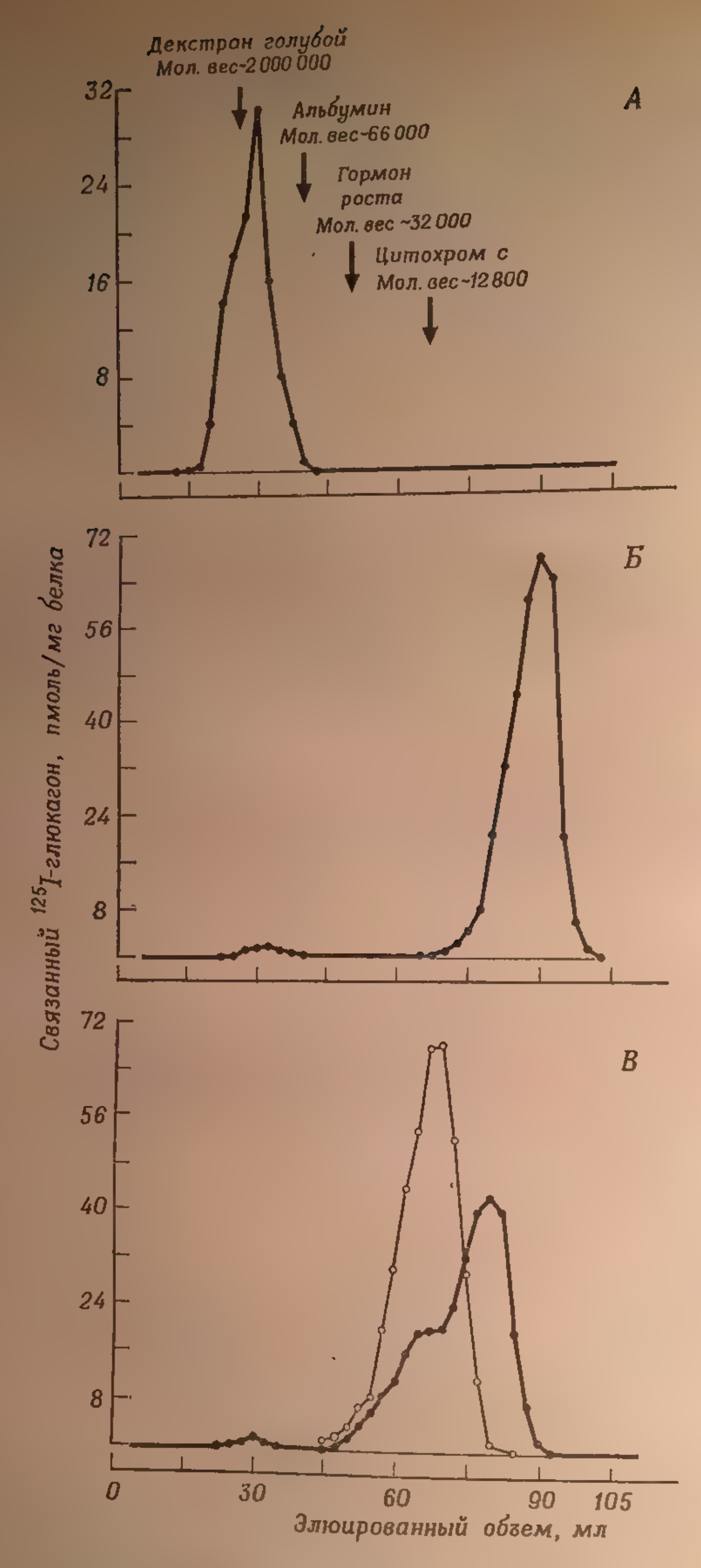



**Рис. 3.** $^{125}$I-глюкагонсвязывающая активность солюбилизированного препарата миокарда, обнаруживаемая при хроматографии на колонках с сефадексом G-100 объемом 86 мл. *А.* Глюкагонсвязывающая активность хроматографируемых фракций. *Б.* Глюкагонсвязывающая активность после преинкубации солюбилизированного препарата с меченым глюкагоном. *В.* Условия эксперимента такие же, как на рис. 3, *Б*, за исключением того, что хроматографию проводили в 0,01 н. NaOH (темные кружки) и 0,025 N NaOH (светлые кружки). (Перепечатано с разрешения American Society of Biological Chemists [18].)

лагаемому молекулярному весу фермента. Молекулярный вес комплекса $^{125}$I-глюкагона со связывающим материалом, рассчитанный на основании сравнения данных электрофоретического разделения (в незначительно отличающихся по концентрации гелях) этого комплекса и белков-стандартов известного молекулярного веса, оказался равным 24 000—28 000 [18].

Подобная диссоциируемая глюкагонсвязывающая активность была обнаружена в солюбилизированном препарате печени кошки в условиях, идентичных описанным выше. Связывание $^{125}$I-глюкагона в препарате печени не изменялось при солюбилизации этого препарата с помощью неионного детергента.

## IV. ОБСУЖДЕНИЕ

Рецепторы гормона обусловливают специфичность гормонального действия на клеточном уровне. Полагают, что аденилатциклаза, изменяя скорость синтеза цАМФ, опосредует индуцируемые гормоном изменения метаболических функций клетки [6]. Поэтому выяснение природы взаимодействия гормональных рецепторов с аденилатциклазой представляет большой интерес.

Глюкагон оказывает на миокард положительное инотропное и хронотропное действие [15]. Очевидно, так же как это происходит в печени и других тканях, действие глюкагона на сердце опосредуется через систему аденилатциклаза — цАМФ [4, 6]. Предполагают, что связывание гормона с плазматическими мембранами клеток миокарда является первой стадией гормональной активации аденилатциклазы [1—3]. Связывание глюкагона с рецепторными участками уже продемонстрировано для мембран печени [4, 19] и поджелудочной железы [20]. Мы использовали солюбилизированный препарат аденилатциклазы миокарда с целью изучения особенностей связывания $^{125}$I-глюкагона со специфическими рецепторами сердечной мышцы.

Родбелл и др. [4], изучавшие взаимодействие глюкагона с плазматическими мембранами клеток печени, накопили обширную информацию о природе глюкагонсвязывающих мест и взаимодействии рецептора с ферментом в печени, на основании чего ими была предложена модель, представленная на рис. 1 [4, 20]. Результаты наших исследований хорошо согласуются с этой моделью, допуская наличие в аденилатциклазной системе трех взаимозависимых субъединиц. Каталитическая субъединица, расположенная на внутренней стороне клеточной мембраны, предназначена для каталитического превращения АТФ в цАМФ. Активность этой субъединицы зависит от доступности субстрата, концентрации магния и других кофакторов, а также от состояния занятости связанного с ней рецептора. В условиях in vitro активность каталитической субъединицы как в солюбилизированном препарате, так и в связанной с мембранами системе может увели-

чиваться в присутствии фтора, и потому стимулируемая под действием фтора активность аденилатциклазы служит маркером указанной субъединицы даже в отсутствие субъединиц рецептора и сопрягающего фактора.

Мы уже показали, что солюбилизация миокарда кошек детергентом лубролом PX приводит к устранению гормональной активации аденилатциклазы под действием гистамина, катехоламинов и глюкагона [12, 13]. Ответ может быть восстановлен при добавлении специфических фосфолипидов: фосфатидилсерина в случае гистамина и глюкагона и фосфатидилинозитола при использовании катехоламинов [21]; аналогичные результаты получили Пол и др. [22], Рети и др. [23] для печени, а также Ямашита и Филд [24] для ткани щитовидной железы. Так был подтвержден постулат о сопрягающем факторе, или «промежуточном звене» между рецептором и аденилатциклазой, роль которого выполняют упомянутые фосфолипиды. Однако, как показывают настоящие и ранее проведенные [25] исследования, солюбилизация не оказывает влияния на связывание гормона, а процесс гормональной активации аденилатциклазы осуществляется отдельно от процесса связывания с рецептором и отличается от последнего [2, 9]. Механизм, посредством которого сопрягающий фактор усиливает активность фермента, по-видимому, зависит от того, как занятый рецептор взаимодействует с каталитической субъединицей.

Считается, что связывание гормона с рецептором оказывает положительное стимулирующее влияние на аденилатциклазу, вызывая ее активацию. Гормон-рецепторный комплекс должен непосредственно усиливать активность аденилатциклазы. В таком случае диссоциация гормон-рецепторного комплекса должна способствовать снижению ферментативной активности до базального уровня. Однако существуют особые взаимодействия лиганда с рецептором, приводящие к удалению ингибитора от каталитической субъединицы и тем самым к активации последней. В качестве примера можно привести процесс активации протеинкиназы системы аденилатциклаза — цАМФ, описанный Тао и др. [26] для ретикулоцитов кролика и Гарреном и др. [27] для коры надпочечников. Изученный нами процесс связывания характеризуется освобождением из высокомолекулярного ферментного комплекса (мол. вес 160 000) белка небольшого молекулярного веса (мол. вес. 24 000—28 000), что приводит к активации этого комплекса только в присутствии соответствующих фосфолипидов. По-видимому, фосфолипиды индуцируют изменения конфигурации каталитического участка, активируя его [21].

Нестимулируемую (или базальную) аденилатциклазу сердца можно рассматривать как каталитическую субъединицу, которую ингибирует близко расположенный не связанный с гормоном рецептор. Схема, в основу которой положено подобное представление, показана на рис. 4. Базальная активность аденилатциклазы в

данном случае обусловлена каталитическими субъединицами, которые отделяются от субъединиц рецептора в процессе выделения препарата фермента. Наши экспериментальные данные свидетельствуют в пользу этой гипотезы. Если связывание гормона наблюдается в присутствии или в отсутствие фосфолипида [18, 25], то активация фермента имеет место только при наличии как глюка-

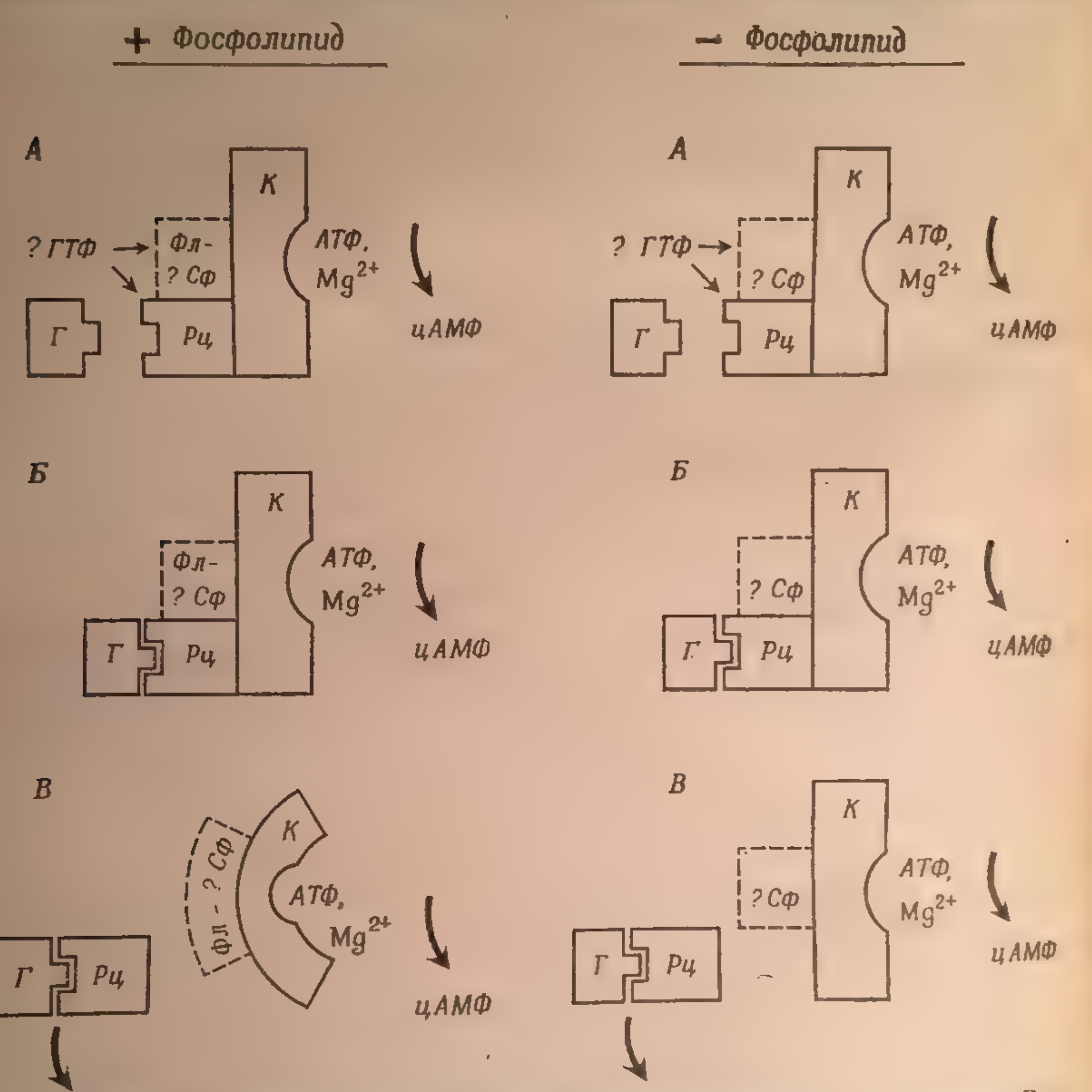



**Рис. 4.** Модель чувствительной к гормону аденилатциклазы. Г — гормон, Рц — рецепторный участок, К — каталитический участок, Сф — сопрягающий фактор. Фл — фосфолипид. (Перепечатано с разрешения American Society of Biological Chemists [18].)

гона, так и фосфатидилсерина [11]. Паратгормон и другие полипептидные гормоны не связываются с рецептором глюкагона, не вызывают освобождения этого рецептора из его комплекса с глюкагоном и не активируют аденилатциклазу. В процессе связывания небольшие молекулы рецептора, обладающие связывающей активностью, отделяются от больших каталитических субъединиц,

молекулярный вес и хроматографическое поведение которых при этом заметно не изменяются. Освобождение рецептора наблюдается только в том случае, если солюбилизированный препарат мембран сначала проинкубировать с гормоном, а затем подвергнуть хроматографии на сефадексе, или электрофорезу в полиакриламидном геле в присутствии ДСН.

На основании результатов работы Сазерленда и его сотрудников [10] можно предполагать, что аденилатциклаза является сложной макромолекулой, часть которой функционирует как рецептор. В случае норадреналина предполагается, что аденилатциклаза (фермент) идентична β-рецептору, обнаруживаемому в сердечной мышце. Вообще говоря, специфичность такой системы должна быть обусловлена тем, что каждая ткань содержит различные молекулярные виды аденилатциклаз для каждого гормона, являющегося стимулятором данной ткани, поскольку установлено, что ткань любого типа способна отвечать соответствующими изменениями метаболических процессов в клетке только на единственный гормон или на определенную группу гормонов. В пользу такой точки зрения свидетельствуют данные об аддитивности активации аденилатциклазы, наблюдаемой при одновременной стимуляции несколькими гормонами, например глюкагоном и адреналином в печени [28] и гистамином и норадреналином в сердце [29]. Это означает, что при одновременном действии двух гормонов суммарная активность аденилатциклазы выше активности, которая могла бы быть получена под влиянием любого из двух гормонов, взятых в максимальных концентрациях. Однако для строгого доказательства данного положения следовало бы очистить фермент и продемонстрировать существование различных молекулярных видов аденилатциклазы. Другое, в равной степени приемлемое объяснение вышеприведенного факта могло бы основываться на уже высказывавшемся нами предположении о том, что аденилатциклазная система является многокомпонентной системой, в результате функционирования которой обычно увеличивается ферментативная активность. Аддитивность гормонального действия в таком случае можно рассматривать как следствие ассоциации многочисленных специфических рецепторов с одной и той же в каждой клетке каталитической субъединицей. Тогда максимальная аддитивная активация должна быть суммой индивидуальных для каждого гормона взаимодействий рецептора с ферментом. В тех же случаях, когда гормональная стимуляция неаддитивна, можно думать, что специфические каталитические субъединицы регулируются рецепторами нескольких типов и занятости только одного из них достаточно для максимальной активации фермента. Компартментация рецепторов определенных гормонов в пределах внутриклеточных структур еще более повышает специфичность этой системы.

В данной главе рассматривается линейная временна́я зависимость связывания $^{125}$I-глюкагона с рецептором. Диссоциация

комплекса гормон — рецептор увеличивается во времени, достигая максимума через 30 мин. Ранее мы обнаружили, что гормональная активация аденилатциклазы также является функцией времени и максимальная активность фермента проявляется через 5 мин. Экстраполируя в обратном направлении, можно полагать, что максимальная гормональная стимуляция фермента наблюдается лишь при частичной занятости рецепторных участков. Отсюда следует существование резервных рецепторов [30]. Резервные рецепторы, учитывая современную модель аденилатциклазной системы, не должны быть разобщены с каталитическими субъединицами. В пользу такого предположения свидетельствуют наши хроматографические данные о присутствии связывающей активности почти целиком в высокомолекулярной фракции, содержащей ферментативную активность. Весьма вероятно, что каждая каталитическая субъединица обладает более чем одним специфическим гормонсвязывающим участком, а активация фермента осуществляется при освобождении только одного или небольшого числа таких участков, в результате чего образуется каталитически функциональный фермент.

Для доказательства наличия диссоциируемых связывающих участков нужен солюбилизированный препарат фермента, свободный от мембран. Взаимодействия глюкагона с рецептором, подобно рассмотренным выше, уже изучены на солюбилизированных препаратах мембран печени [18]. Система интактных мембран в дополнение к каталитическому рецептору и описанным здесь субъединицам должна также содержать некоторую структурную единицу, которая бы поддерживала комплекс гормона с рецептором в относительной близости к активируемому затем ферменту. В таком случае последующая диссоциация гормона из комплекса с рецептором должна приводить к рекомбинации рецепторной и каталитической субъединиц и инактивации аденилатциклазы. Неспособность же $^{125}$I-глюкагона быстро высвобождаться из комплекса с рецептором даже при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии ДСН, по-видимому, обусловлена аллостерическими изменениями в молекуле рецептора, индуцированными лигандом [31, 32]. Недавно полученные данные действительно позволяют думать, что в процессе рецепторного связывания происходит изменение конфигурации существенно важных для аденилатциклазной системы сульфгидрильных групп, благодаря чему повышается их чувствительность к инактивирующему действию иодацетамида [33]. Отсюда следует, что рецептор может легко диссоциировать из комплекса с гормоном и вновь образовывать неактивный трехкомпонентный комплекс только в присутствии каталитической субъединицы (и, возможно, специфических фосфолипидов). Хотя с помощью длительного диализа $^{125}$I-глюкагон можно удалить из фракции с более низким мол. весом, процесс этот медленный и неэффективный [18]. Есть сообщения также о прочной ассоциа-

ции гормона с рецептором в мембранах не только печеночных, но и других клеток, специфически связывающих глюкагон [19].

Результаты наших исследований показали, что при хроматографии препарата солюбилизированных мембран глюкагонсвязывающая фракция элюируется в зоне, соответствующей по молекулярному весу веществам, для разделения которых используется сефадекс G-100. Для определения молекулярного веса $^{125}$I-глюкагон-рецепторного комплекса с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН были использованы два полученных разными способами образца этих комплексов: в первом случае глюкагонсвязывающую фракцию сначала разделяли на сефадексе, а затем инкубировали с $^{125}$I-глюкагоном; во втором — инкубация свободного от детергента солюбилизированного фермента с меченым гормоном предшествовала хроматографическому разделению. В обоих случаях связанная радиоактивность обнаруживалась в полиакриламидном геле (при сравнении с белками-маркерами) в области, соответствующей соединениям с мол. весом 24 500—28 000 [18]. Замедленное элюирование этих гормон-рецепторных комплексов при хроматографии на сефадексе в зоне, соответствующей выходу солей, обусловлено адсорбцией комплексов на колонке. Эти свойства комплексов могут быть использованы для дальнейшей очистки рецепторов. В настоящее время с целью выделения и очистки рецепторов из различных препаратов делаются попытки применить гранулы сефарозы, связанной со специфическими лигандами (гормонами) [19]. Принимая во внимание наши данные, следует заранее оговорить, что в используемой системе можно связать рецептор с лигандом, но при этом фермент должен диссоциировать из комплекса и ферментативная активность уже не будет служить маркером, свидетельствующим о наличии рецептора.

На основании представленных данных построена модель активации аденилатциклазы под действием глюкагона. Как показано на рис. 4, связывание гормона вызывает диссоциацию специфического рецептора из его комплекса с каталитической субъединицей. Этот процесс в дальнейшем приводит к активации фермента только в присутствии специфических фосфолипидов, благодаря которым происходят конформационные изменения в активном участке каталитической субъединицы. Как видно из рис. 4, диссоциация будет осуществляться и в отсутствие фосфолипидов, но никакого увеличения ферментативной активности при этом не произойдет. Следует ожидать, что рецепторная субъединица не будет диссоциировать из комплекса под действием химически модифицированных гормонов, например дегистидинглюкагона, которые, как показано, угнетают связывание гормона, но не приводят к активации фермента [34]. Для дальнейшего доказательства справедливости этой модели необходимо показать, что добавление несвязанного рецептора к активированному ферменту вызывает умень-

шение ферментативной активности. Однако получить такое подтверждение пока еще не представляется возможным, поскольку не удается достигнуть высокой степени очистки фермента без существенной потери его активности.

## Благодарность

Исследования, изложенные в данной главе, частично были поддержаны фондом NIH grant HL 31715-05.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pastan I., Roth J., Macchia V.*, Proc. Natl. Acad. Sci., *56*, 1802 (1966).
2. *Lefkowitz R. J., Roth J., Pricer W., Pastan I.*, Proc. Natl. Acad. Sci., *65*, 745 (1970).
3. *Klein I., Fletcher M. A., Levey G. S.*, *J.* Biol. Chem., *248*, 5552 (1973).
4. *Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S. L.*, in: The Pole of Adenyl Cyclase and Cyclic 3'5'-AMP, in: Biological Systems (T. W. Rall, M. Rodbell and P. Condliife, eds.), Fogarty International Center, Bethesda, Maryland, 1971, p. 59.
5. *Lefkowitz R. J., Haber E.*, Proc. Natl. Acad Sci., *68*, 1773 (1971).
6. *Robison G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W.*, in: Cyclic AMP, Academic Press, New York and London, 1971.
7. *Sutherland E. W., Robison G. A., Butcher R. W.*, Circulation, *37*, 279 (1968).
8. *Lefkowitz R. J., Roth J., Pastan I.*, Nature, *228*, 864 (1970).
9. *Lefkowitz R. J., Levey G. S.*, Life Sci., *2*, 821 (1972).
10. *Robison G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., *139*, 703 (1967).
11. *Levey G. S.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., *185*, 449 (1971).
12. *Levey G. S., Klein I.*, *J.* Clin. Invest., *51*, 1578 (1972).
13. *Levey G. S.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *38*, 86 (1970).
14. *Lefkowitz R. J., Haber E., O'Hara D.*, Proc. Natl. Acad. Sci., *69*, 2828 (1972).
15. *Levey G. S., Epstein S. E.*, Circ. Res., *24*, 151 (1969).
16. *Krishna G., Weiss B., Brodie B. B.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., *163*, 379 (1967).
17. *Hunter W. M., Greenwood F. C.*, Nature, *194*, 495 (1962).
18. *Levey G. S., Fletcher M. A., Klein I., Ruiz I., Schnenk A.*, J. Biol. Chem., *249*, 2665 (1964).
19. *Krug F., Desbuquois B., Cuatrecasas P.*, Nature New Biol. J., *234*, 268 (1971).
20. *Goldfine I. D., Roth J., Birnbaumer L.*, J. Biol. Chem., *247*, 1211 (1972).
21. *Levey G. S., Fletcher M. A., Klein I.*, Adv. Cyclic Nucleotide Res. (1975).
22. *Pohl S. L., Krans H. M. J., Kozyreff V., Birnbaumer L., Rodbell M.*, J. Biol. Chem., *247*, 4447 (1971).
23. *Rethy A., Tomasi V., Trevisani A., Barnabei O.*, Biochim. Biophys. Acta., *290*, 58 (1972).
24. *Yamashita K., Field J. B.*, Biochim. Biophys. Acta., *304*, 686 (1973).
25. *Levey G. S.*, Rec. Prog. Horm. Res., *29*, 361 (1973).
26. *Tao M., Salas M. L., Lipmann F.*, Proc. Natl. Acad. Sci., *67*, 408 (1970).
27. *Garren L. D., Gill G. N., Walton G. M.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., *185*, 210 (1971).
28. *Bitensky M. W., Russell V., Robertson W.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *31*, 706 (1968).
29. *Klein I., Levey G. S.*, J. Clin. Invest., *50*, 1012 (1971).
30. *Nickerson M.*, Nature, *178*, 697 (1956).
31. *Maddaiah V. T.*, *J.* Theor. Biol., *25*, 495 (1969).
32. *Koshland D. E., Jr.*, Annu. Rev. Biochem., *37*, 359 (1968).
33. *Storm D. R., Dolginow Y. D.*, J. Biol. Chem., *248*, 5208 (1973).
34. *Modbell M., Birnbaumer L., Pohl S. L., Sundby F.*, Proc. Natl. Acad. Sci., *68*, 909 (1971).

## Глава 4

# СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ ГЛЮКАГОНА ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ПЕЧЕНИ

*М. БЛЕЧЕР И С. ГОЛДСТЕЙН*

Department of Biochemistry
Georgetown University Medical Center
Washington, D. C.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Плазматические мембраны (ПМ) в том виде, в каком они изолированы с помощью методов дифференциального и градиентного центрифугирования [1] из паренхиматозных и ретикулоэндотелиальных клеток печени крыс, детально охарактеризованы в отношении их составных частей и ферментов-маркеров [2]; установлено, что в препаратах мембран связывание глюкагона и инсулина, а также стимулируемая гормоном аденилатциклазная активность остаются стабильными в течение многих месяцев хранения при —90° С или ниже [3].

Благодаря изящным исследованиям, последовательно проводимым в течение длительного времени в лаборатории Родбелла, накоплена обширная информация о взаимоотношении связывания глюкагона плазматическими мембранами печени крыс, полученными по методу Невилла, и активацией аденилатциклазы. Было показано, что связывание глюкагона является специфическим, быстрым, насыщаемым и обратимым. Это связывание отличается высоким сродством [4], и, по-видимому, не сопряжено с процессами деградации гормона [5], но тормозится фосфолипазой А и детергентами, т. е. агентами изменяющими липопротеидные структуры мембран [6]. Зависимость связывания глюкагона плазматическими мембранами печени крыс от концентрации гормона, очевидно, не идентична зависимости активации аденилатциклазы под действием глюкагона, поскольку полная гормональная стимуляция фермента достигается при 10—20% занятости глюкагоном специфических связывающих мест. Эти данные свидетельствуют о существовании запасных, или избыточных рецепторов, непосредственно не связанных с аденилатциклазой [7]. Альтернативное объяснение предложил Родбелл [4] на основании наблюдений о том, что глюкагон и определенные нуклеотиды, например ГТФ, активируют аденилатциклазу путем согласованного или взаимо-

зависимого процесса, включающего индуцируемые лигандом конформационные изменения ферментной системы. Согласно его гипотезе [4], запасные рецепторы скорее всего являются функциональными рецепторами, активация которых задерживается, но под действием ГТФ такая задержка устраняется.

Из этого краткого обзора данных, касающихся глюкагон-рецепторной системы в плазматических мембранах печени крыс, ясно, что к моменту начала наших исследований (1971 г.) многие из известных фактов носили чисто описательный характер, а механизм взаимодействия глюкагона с рецепторами плазматических мембран был мало изучен. Мы убеждены, что прямой подход к решению механизма действия глюкагона состоит в том, чтобы солюбилизировать и очистить мембранную систему и изучить ее способами, которые обычно используются для исследования взаимодействий белков с лигандами в однофазных гомогенных системах.

Прежде чем приступить к получению солюбилизированных препаратов, необходимо условиться, что́ следует растворить и что́ должно быть исследовано. Идеально было бы солюбилизировать целиком весь комплекс рецептор — аденилатциклаза, а затем расчленить этот комплекс, выделить отдельные его компоненты и изучить их. Для решения этой проблемы было использовано множество изощренных подходов, но, к сожалению, с ограниченным успехом. В предыдущей главе этой книги описаны разработанные Леви [8] методики солюбилизации аденилатциклазы из миокарда кошки; выделенный в соответствии с ними солюбилизированный фермент сохранял чувствительность к глюкагону и норадреналину после удаления детергента (луброла РХ) и добавления в высоких концентрациях специфических фосфолипидов мозга. Полученные экстракты из мышцы сердца, как было затем показано [9], также связывали глюкагон. Однако эти сообщения [8, 9] не были подтверждены в дальнейшем, а предложенные методы оказались непригодными для получения солюбилизированных препаратов из печени и других тканей. Более того, имеются основания полагать, что связывание глюкагона, наблюдаемое в экстрактах ткани миокарда, является неспецифическим: а) во-первых, для определения минимального связывания $^{125}$I-глюкагона с компонентами таких экстрактов требуются концентрации гормона приблизительно $10^{-7}$ М, т. е. в 1000 раз выше концентрации, необходимой для насыщения глюкагонсвязывающих макромолекул как в препаратах частиц клеток печени, так и в солюбилизированных препаратах рецептора из этой же ткани [3]; б) во-вторых, общепринято считать физиологическими тканями-мишенями глюкагона только печень и поджелудочную железу [11]. Другие исследователи [3, 10, 12], используя луброл РХ, солюбилизировали аденилатциклазу из плазматических мембран печени крысы, полученных по методу Невилла, и не смогли выявить чувствительности этого фермента к глюкагону ни при каких условиях. Однако позднее мы [13] про-

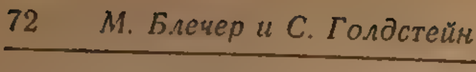
верили способность неочищенных и очищенных солюбилизированных препаратов аденилатциклазы из печени крыс (любезно предоставленных д-ром Свислоки) связывать $^{125}$I-глюкагон и обнаружили связывание в высокоочищенных препаратах, но способность к связыванию исчезла после однократного замораживания и оттаивания этого препарата.

Поскольку солюбилизация и выделение каждого компонента системы рецептор — аденилатциклаза является трудно разрешимой задачей, мы посчитали более целесообразным другой путь, а именно солюбилизацию и выделение только рецепторных макромолекул, полагая, что они существуют в плазматических мембранах. Преимущество этого подхода состоит в том, что поначалу по крайней мере не нужно заботиться о сохранении целостности каталитического белка. Недостаток же такого подхода связан с обязательным допущением, что выделенный глюкагонсвязывающий белок действительно является физиологическим мембранным рецептором.

Ниже мы опишем попытки, которые начиная с 1971 г. предпринимались с целью солюбилизировать, идентифицировать, очистить и охарактеризовать рецепторы глюкагона, присутствующие в приготовленных по методу Невилла [1] плазматических мембранах печени крыс.

## II. СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ИЗ ПРЕДВАРИТЕЛЬНО МЕЧЕНЫХ МЕМБРАН

В одном из наших сообщений [14] мы описали методы солюбилизации плазматических мембран печени крыс с помощью неионного детергента луброла PX после предварительного насыщения связывающих мест в мембранах слабоиодированным глюкагоном (в среднем 0,6 атомов $^{125}$I на 1 моль). Глюкагонсвязывающие белки идентифицировали в осветленных экстрактах с помощью гель-фильтрации на 8%-ной агарозе в присутствии детергента (рис. 1). В таких условиях, т. е. при концентрации луброла PX, превышающей его критическую мицеллярную концентрацию, равную приблизительно 0,18 мМ (0,009%) [15], все связывающие белки элюируются в свободном объеме, и это позволяет считать, что мол. вес указанных белков больше $1{,}5 \cdot 10^6$. Важно отметить (рис. 1), что $^{125}$I-глюкагон (амфипатическая молекула) связывается с мицеллами детергента, образуя комплекс, который элюируется с колонки (пики *B* и *B′*) в зоне выхода макромолекул с мол. весом 120 000—150 000. Этот комплекс, разумеется, можно было бы ошибочно идентифицировать как гормонсвязывающий белок, если бы в элюатах не определяли одновременно как белок, так и радиоактивность и если бы не был поставлен соответствующий контроль — пропускание через колонку меченого гормона в отсутствие экстракта мембран.



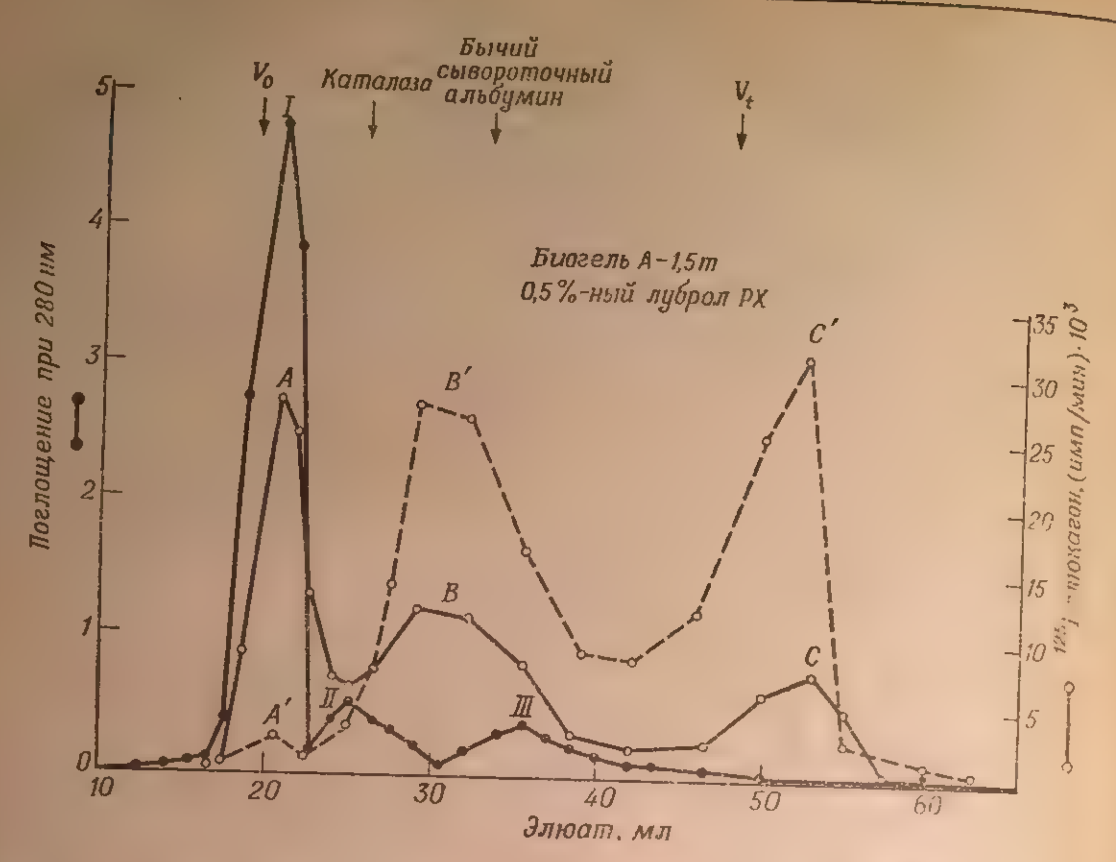




**Рис. 1.** Гель-фильтрация на биогеле A-1,5 m в присутствии 0,5%-ного луброла PX насыщенных $^{125}$I-глюкагоном белков экстрактов плазматических мембран печени. Профиль элюции $^{125}$I-глюкагона в отсутствие экстрактов ткани показан светлыми кружками [15].

## III. ПОВЕДЕНИЕ ГЛЮКАГОНА И ИНСУЛИНА ПРИ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ В ПРИСУТСТВИИ ДЕТЕРГЕНТОВ

Доказательство того, что пики *B* и *B′* на рис. 1 соответствуют $^{125}$I-глюкагону, связанному с мицеллами детергента, было получено при гель-фильтрации $^{125}$I-глюкагона через 6%-ную агарозу сначала в присутствии, а затем в отсутствие забуференного 0,5%-ного луброла PX (рис. 2) или тритона X-100 (данные не приводятся). В присутствии детергента появляются как «макромолекулярный» $^{125}$I-глюкагон (пик *A*), так и «несвязанный» $^{125}$I-глюкагон (пик *Б*). При хроматографии $^{125}$I-глюкагона на той же самой колонке после удаления из системы детергента элюируется только несвязанный глюкагон в объеме, соответствующем $V_t$ колонки.

Ассоциация глюкагона с мицеллами детергента, приводящая к образованию макромолекулярных комплексов, наблюдается не только в присутствии неионных детергентов. На рис. 3 приведена кривая элюции $^{125}$I-глюкагона при гель-фильтрации в присутствии критической мицеллярной концентрации (около 120 мкМ) [16] лизолецитина. С колонки элюируются два вида $^{125}$I-глюкагона: один с мол. весом явно выше 50 000 (связанный с мицеллами),

а другой — несвязанный, элюируемый в объеме, соответствующем $V_t$ колонки.

Инсулин также связывается с мицеллами детергента. В тот период, когда мы обнаружили, что глюкагон связывается с мицеллами луброла PX, появилось сообщение из лаборатории Куатрекасаса [17], в котором описывалась солюбилизация рецептора инсу-

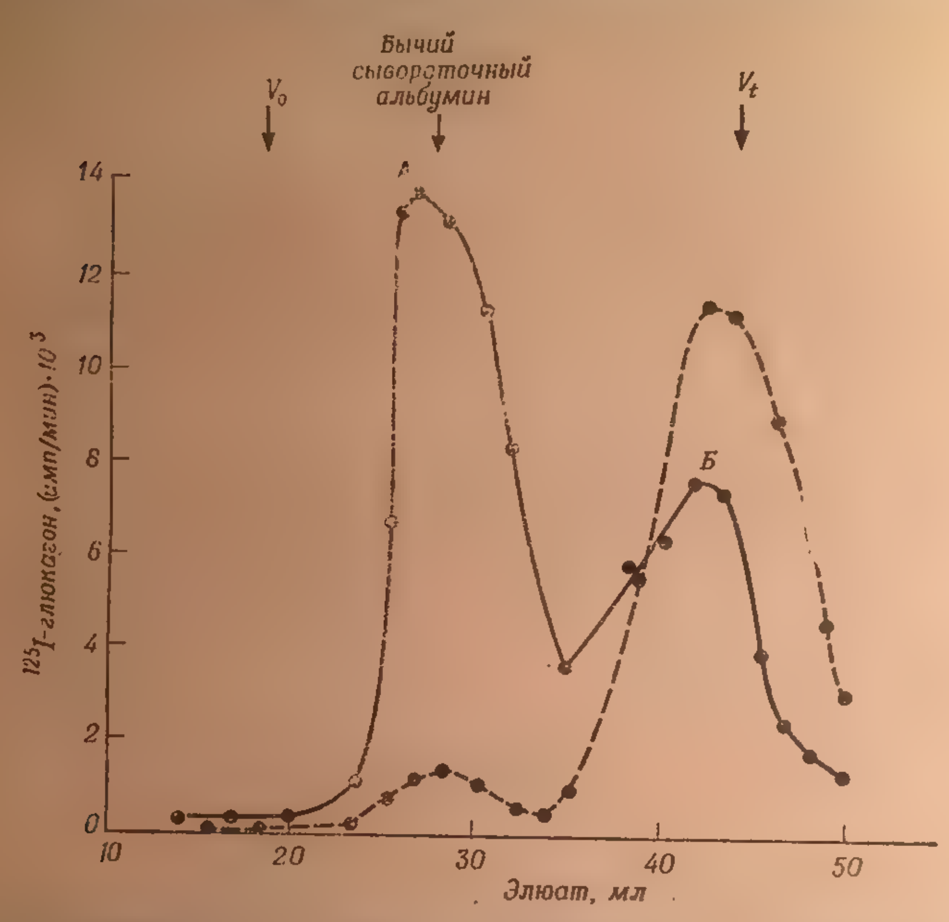



**Рис. 2.** Гель-фильтрация $^{125}$I-глюкагона на сефарозе 4B в присутствии (сплошная линия) и в отсутствие (штриховая линия) 0,5%-ного луброла PX. В качестве белка-маркера использовали бычий сывороточный альбумин (мол. вес 66 000).

лина из мембран печени с помощью другого неионного, полиэтоксидного детергента — тритона X-100. Мы решили проверить, связывается ли инсулин мицеллами этого детергента с образованием высокомолекулярных комплексов. Мы поставили некоторые контроли к экспериментам, опубликованным Куатрекасасом [17], а именно провели экстракцию и гель-фильтрацию в отсутствие мембран печени. Результаты двух таких контрольных экспериментов показаны на рис. 4. Верхняя пунктирная линия (рис. 4, *А*) представляет собой кривую элюции с сефадекса G-50 $^{125}$I-инсулина в отсутствие тканевого экстракта, а непрерывная линия — это кривая элюции $^{125}$I-инсулина в присутствии экстракта мембран клеток печени [17]. Видно, что форма кривых элюции

$^{125}$I-инсулина одинакова в обоих случаях. На рис. 4, *Б* представлены результаты рехроматографии на сефадексе G-50 объединенных фракций, элюируемых первоначально в объеме, соответствующем $V_0$. И снова в обоих случаях, т. е. в отсутствие (контрольный эксперимент) или в присутствии [17] компонентов мембран, происходит частичная диссоциация $^{125}$I-инсулина из его «макромолеку-

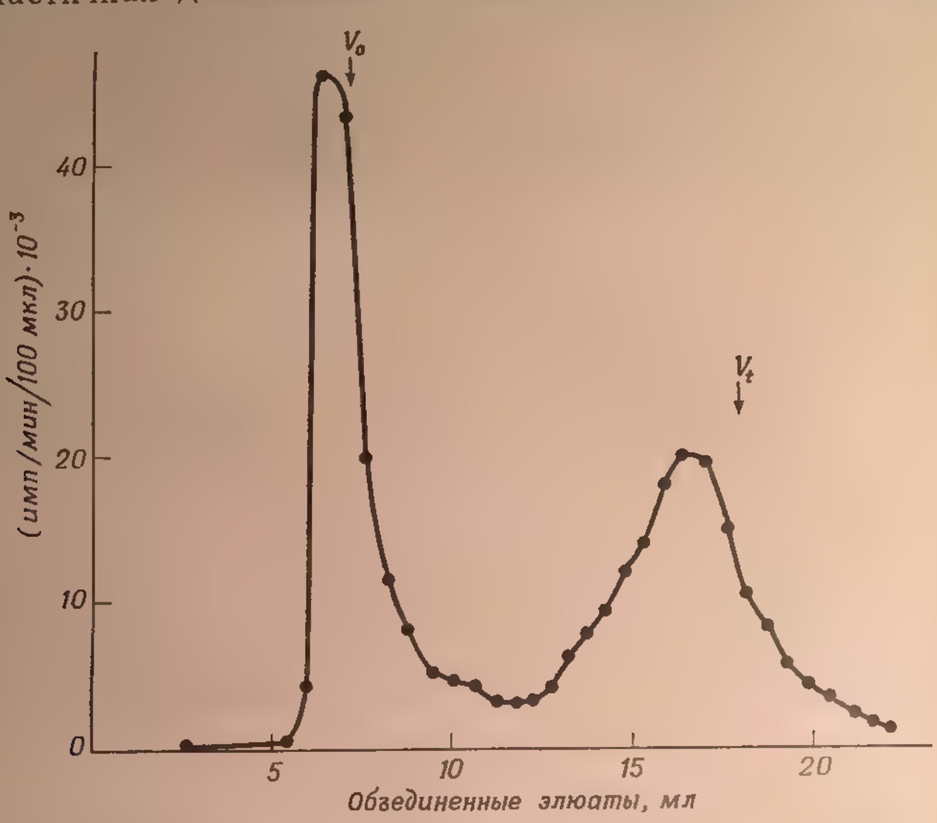



**Рис. 3.** Гель-фильтрация $^{125}$I-глюкагона на сефадексе G-50 в присутствии 120 мкМ лизолецитина.

лярного» комплекса, и этот теперь уже несвязанный материал элюируется в своем обычном объеме, т. е. соответствующем $V_t$ колонки.

Специфическое и неспецифическое связывание инсулина обычно понимают как присоединение инсулина к рецепторам на клеточной поверхности; аналогично этому инсулин может связываться и с мицелами тритона X-100. Так, в приводимом на рис. 5 эксперименте, который также взят из работы Куатреказаса, был поставлен контроль на связывание гормона с используемыми реагентами, идентичный показанному на рис. 4, *А*. Контроль заключался в том, что перед добавлением следовых количеств $^{125}$I-инсулина пробы преинкубировали с большим избытком нативного инсулина, а затем смесь хроматографировали на сефадексе G-50. Результаты показали, что нативный инсулин уменьшает количество $^{125}$I-инсулина, связанного с материалом, который элюируется в объеме

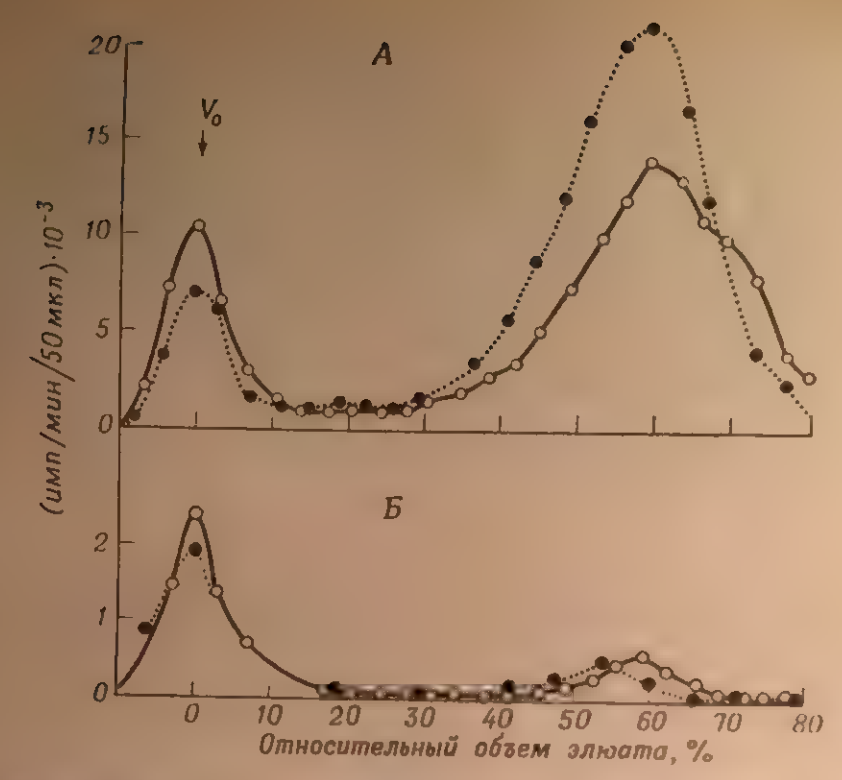



**Рис. 4.** *А*. $^{125}$I-инсулин (4,8 нг) инкубировали с 1 мг бычьего сывороточного альбумина в буфере (0,1% БСА — 0,5%-ный тритон Х-100 в бикарбонатном буфере Кребса—Рингера, pH 7,5) в течение 20 мин при 25° С, а затем пропускали при 4° С через колонку с сефадексом G-50 (1×45 см) в буфере в присутствии (светлые кружки) и в отсутствие (темные кружки) материала, солюбилизированного из мембран клеток печени. Мембраны представляли собой осаждаемые при 12 000—40 000 g частицы из гомогенатов клеток, обработанных политроном РТ-10 [17]. *Б*. Аликвоты по 1 мл объединенных элюатов, соответствующих свободному объему колонки (см. *А*), сразу рехроматографировали на тех же колонках в присутствии (светлые кружки) и в отсутствие (темные кружки) компонентов ткани.

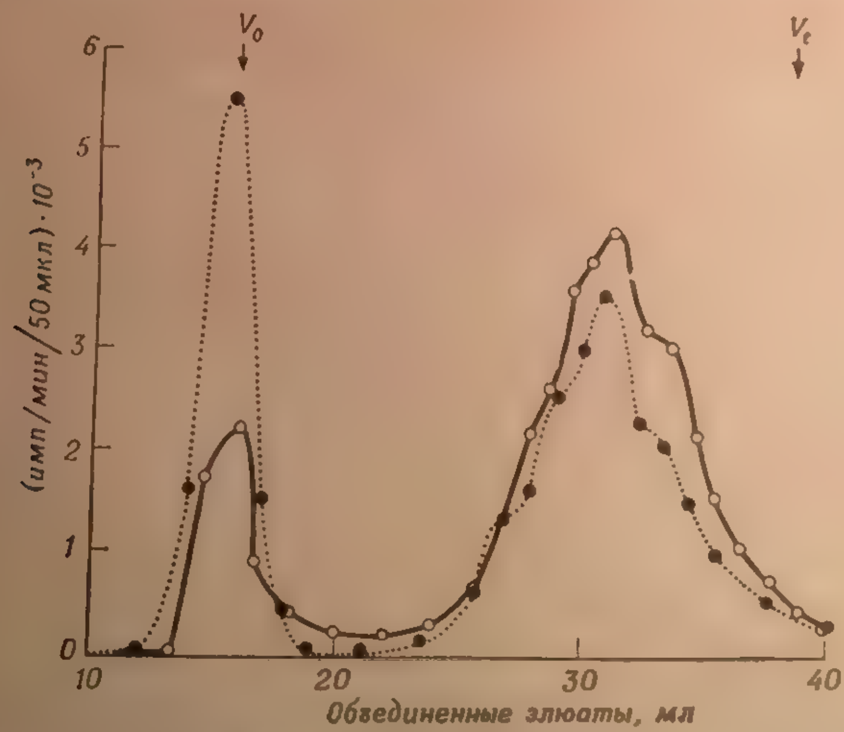



**Рис. 5.** Гель-фильтрация на сефадексе G-50 (1,5×28 см) 4,8 нг $^{125}$I-инсулина и 1,0 мг БСА в буфере (см. рис. 4) после (светлые кружки) и без (темные кружки) преинкубации с 25 мкг нативного инсулина.

соответствующем $V_0$ колонки; те же самые закономерности в связывании обнаруживаются и в смеси, содержащей экстракт плазматических мембран клеток печени [17].

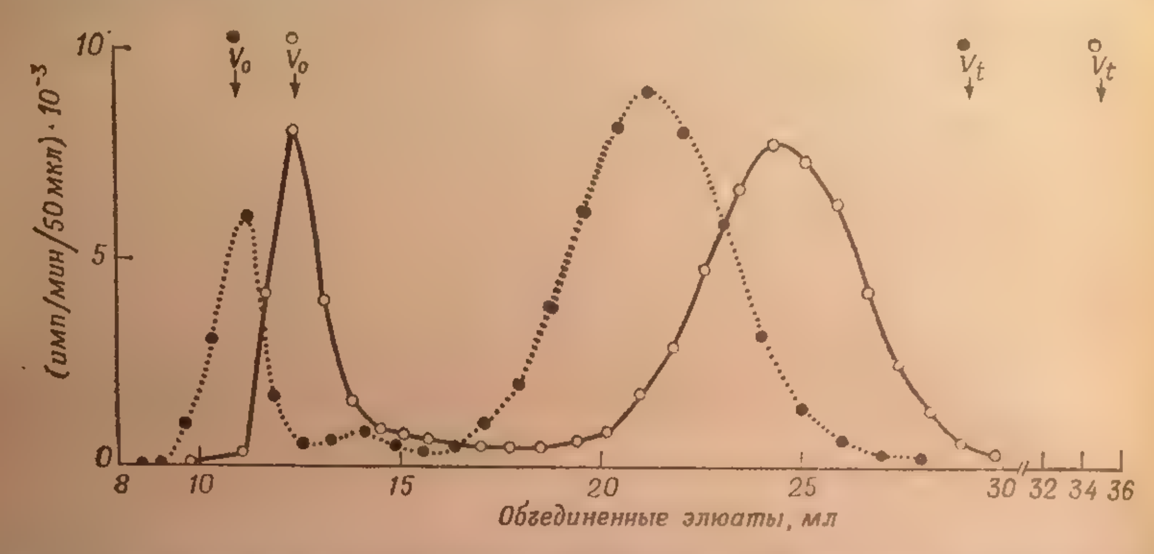



**Рис. 6.** Гель-фильтрация на сефадексе G-50 4,8 нг $^{125}$I-инсулина с 1,5 мг БСА в буфере (ср. с рис. 4) в присутствии (светлые кружки) и в отсутствие (темные кружки) 0,5%-ного тритона X-100; для наглядности результатов были специально использованы колонки разной длины.

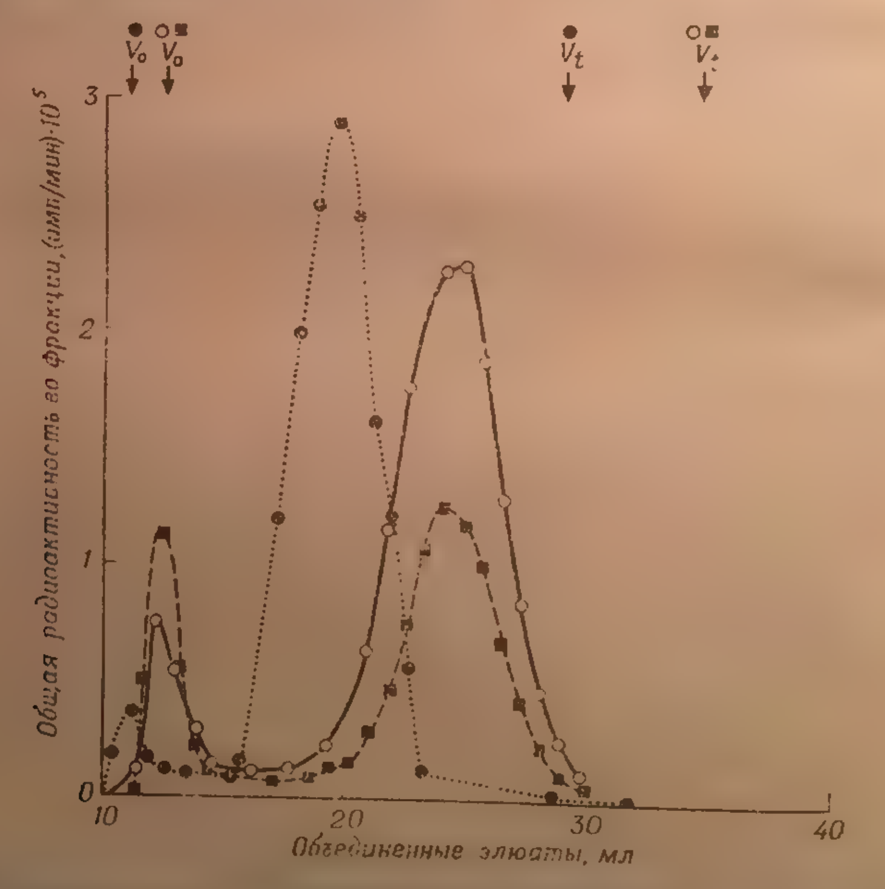



**Рис. 7.** Гель-фильтрация на сефадексе G-50 $^{125}$I-инсулина после инкубации с 1500 мг (■), 440 мкг (○) и 50 мкг (●) БСА. Использовали буфер Кребса—Рингера, содержащий 0,5%-ный тритон X-100, и колонки разной длины.

В упомянутых контрольных экспериментах (рис. 4 и 5) с мицеллами тритона Х-100 связывался не весь $^{125}$I-инсулин из фракции $V_0$. Из сравнения кривых элюции $^{125}$I-инсулина в присутствии и в отсутствие тритона Х-100 видно, что при устранении детергента количество $^{125}$I-инсулина во фракции, соответствующей свободному объему колонки с сефадексом G-50, уменьшается (с 22 до 14% общей элюируемой радиоактивности), но все же остается довольно значительным (рис. 6). Очевидно, $^{125}$I-инсулин должен связываться с высоким сродством и с бычьим сывороточным альбумином (БСА), так как это единственный, кроме инсулина, макромолекулярный компонент инкубационной смеси, который не проникает в гранулы данного геля.

Справедливость этого заключения была проверена при использовании различных количеств БСА в исследуемой инкубационной смеси, содержащей $^{125}$I-инсулин. В присутствии стандартных количеств БСА [17], т. е. 1,5 мг, во фракции свободного объема колонки содержится 22,3% общего $^{125}$I-инсулина, элюируемого с колонки; в присутствии 440 мкг или 50 мкг БСА количество меченого гормона в указанной фракции уменьшается соответственно до 10,6 и 5,4% (рис. 7). Из всех приведенных данных следует, что для правильной идентификации мембранных рецепторов в экстрактах, приготовленных с помощью ионных и неионных детергентов, необходим строгий контроль.

## IV. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОЧИСТКА ГЛЮКАГОНСВЯЗЫВАЮЩИХ МАКРОМОЛЕКУЛ ИЗ ЭКСТРАКТОВ С НИЗКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ЛУБРОЛА

### А. Приготовление экстрактов с низким содержанием луброла

В результате изучения поведения $^{125}$I-глюкагона в присутствии мицелл луброла РХ и тритона Х-100 были выявлены условия, при которых глюкагонсвязывающие белки экстрактов мембран остаются в растворе, содержащем детергент в концентрациях ниже его критической мицеллярной концентрации (КМК).

После приготовления экстрактов плазматических мембран печени в забуференном 0,5%-ном луброле РХ по ранее описанному способу [15, 18] концентрацию детергента снижали по теоретическим расчетам до 0,001% диализом в трубках Вискинга и пропусканием через фильтры фирмы Amicon (табл. 1).

### Б. Гель-фильтрация

Когда аликвоты экстрактов с низким содержанием луброла инкубировали с $^{125}$I-глюкагоном, взятом в избытке, а затем смесь фильтровали через сефарозу 4В в отсутствие луброла РХ, белки, связывающие глюкагон (так же, как основная масса белковых примесей), проникали в поры геля (рис. 8). Положение пика элюируемых глюкагонсвязывающих белков (общий объем элюа-

Таблица 1

**Концентрация луброла PX на разных стадиях выделения глюкагонсвязывающих белков [27]**

| Номер эксперимента | Стадия | Концентрация луброла PX: рассчитанная с помощью разведения, % | Концентрация луброла PX: рассчитанная с помощью $^{14}$C-луброла PX, % |
|---|---|---|---|
| I | 1. Исходные экстракты ПМ | 0,5 | 0,5 |
| | 2. Материал, задерживаемый на фильтрах Amicon | | |
| | первая промывка | 0,1 | 0,185 |
| | вторая промывка | 0,02 | 0,140 |
| | третья промывка | 0,004 | 0,126 |
| | четвертая промывка | 0,0008 | 0,119 |
| | 3. Элюат с колонки гидроксилапатита | | |
| | до концентрирования | | 0,009 |
| | после концентрирования в конической пробирке | | 0,070 |
| | в пробах при определении связывания глюкагона | | 0,003 |
| II | 1. Исходный экстракт мембран | 0,5 | 0,5 |
| | 2. Материал после диализа | 0,003 | 0,160 |
| | 3. Материал, задерживаемый на фильтрах Amicon | 0,0003 | 0,140 |

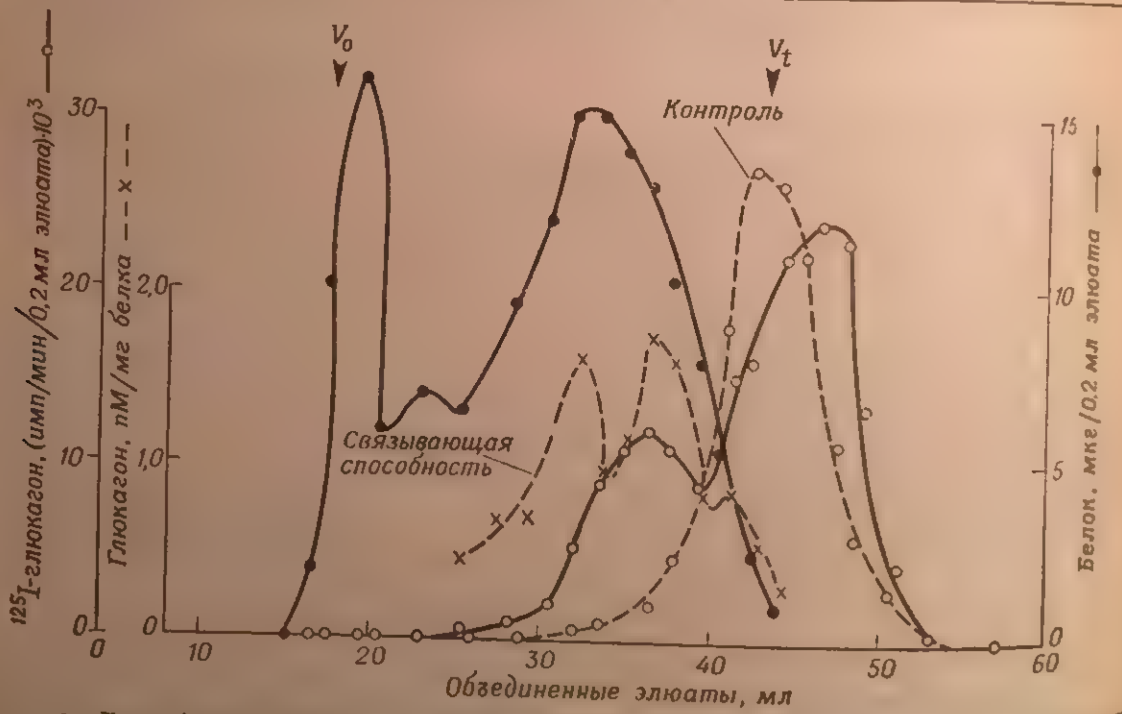



Рис. 8. Гель-фильтрация на сефарозе 4B насыщенных $^{125}$I-глюкагоном экстрактов плазматических мембран с низким содержанием луброла (сплошные линии). Используемый для элюции буфер не содержал детергента, и $^{125}$I-глюкагон появлялся в этом случае в отсутствие экстракта мембран (светлые кружки) только во фракции элюата, соответствующей $V_t$. В параллельно выполненных экспериментах без $^{125}$I-глюкагона количественное определение связывания во фракции, содержащей белки, «включаемые» в поры геля (объем элюата от 22 до 44 мл), проводили модифицированным нами методом Хуммеля — Дрейера; × — связывающая способность [15].

та 30—40 мл) указывает на резкое уменьшение размера этих белков по сравнению с белками, обнаруживаемыми в ранее описанных условиях (рис. 1). Параллельно были проведены аналогичные эксперименты без добавления $^{125}$I-глюкагона, в которых отбирали элюаты, содержащие «включаемые» в поры геля белки, и количественно оценивали их связывающую способность модифициро-

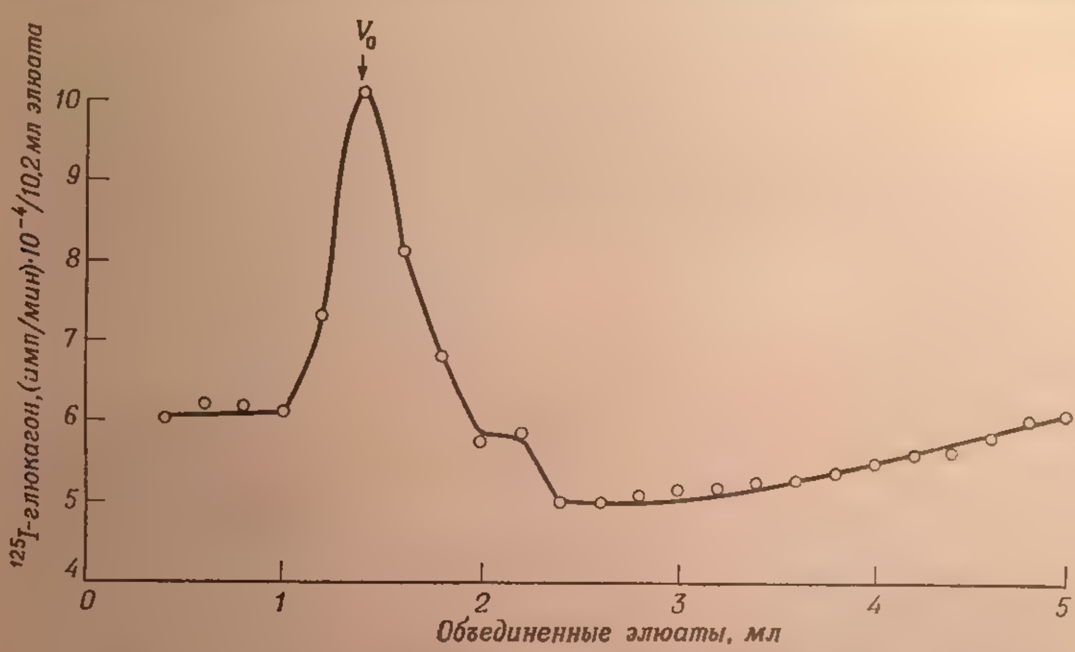



**Рис. 9.** Кривая элюции с сефадекса G-50 при количественном определении связывания по модифицированному методу Хуммеля — Дрейера. Пробу, содержащую частично очищенные глюкагонсвязывающие белки (1,4 мкг), инкубировали в течение 15 мин при 30° С в 0,5 мл буфера, в котором проводили гель-фильтрацию на колонке (0,6 нг/мл $^{125}$I-глюкагон — 10 мМ ЭДТА — 0,1%-ный БСА в 20 мМ *трис*-буфере, pH 7,6). Смесь охлаждали при 4° С и аликвоту 200 мкл хроматографировали на колонке с сефадексом G-50 (0,7×8 см), используя указанный буфер. Условия стандартного метода определения связывания [15] были изменены в этом эксперименте для того, чтобы обеспечить непрерывную элюцию в указанном буфере. Фракции элюата ( ~200 мкл) собирали в сосудики для определения радиоактивности; общая радиоактивность составляла 82 967 имп/мин, тогда как радиоактивность, теоретически соответствующая эквивалентному количеству радиоактивного глюкагона, который экстрагировался связывающими белками в буфере, пропускаемом через колонку, составляла 85 415 имп/мин [15].

ванным нами методом Хуммеля — Дрейера (рис. 9) [15, 18]; полученные данные соответствовали результатам качественного тестирования глюкагонсвязывающих белков (рис. 8). Важно отметить (рис. 8), что в контрольных экспериментах по связыванию $^{125}$I-глюкагона (без экстракта мембран) было показано, что комплексы гормона с мицеллами в этих условиях не образуются.

Количественная оценка связывающей активности, представленной соответствующей кривой на рис. 8, позволяет предположить наличие по крайней мере двух глюкагонсвязывающих белков

в экстрактах мембран с низким содержанием луброла. Мы пытались разделить эти белки гель-фильтрацией через мелкопористое молекулярное сито. Когда аликвоты такого экстракта инкубировали в присутствии избытка $^{125}$I-глюкагона, а затем смесь пропускали через колонку с биогелем 1,5 m (8%-ная агароза), приблизительно половина общего количества связанного с белком $^{125}$I-

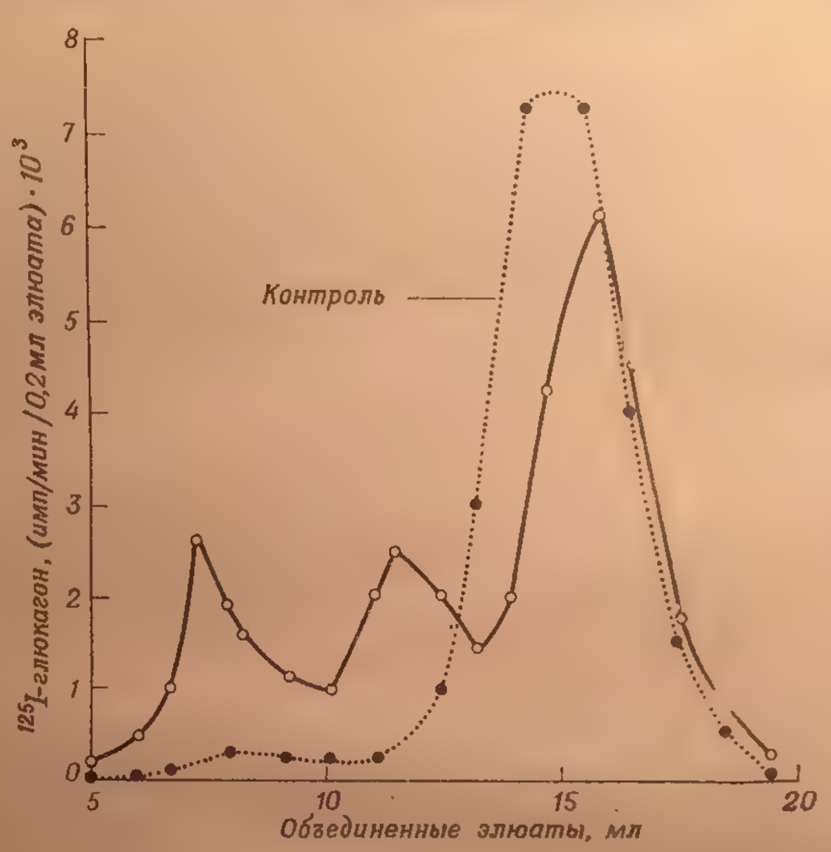



**Рис. 10.** Гель-фильтрация на биогеле А-1,5 m (0,9×28 см) экстракта мембран (1,8 мг белка) с низким содержанием луброла, насыщенного 1,2 нг $^{125}$I-глюкагона. Содержание радиоактивного глюкагона в элюатах определяли в присутствии (светлые кружки) и в отсутствие (контроль, темные кружки) экстракта мембран [15].

глюкагона оказывалась ассоциированной с макромолекулами, элюируемыми в свободном объеме (мол. вес $\sim 1,5 \cdot 10^6$), а остальное количество — с белками меньшего молекулярного веса ($\sim$200 000) (рис. 10).

## В. Хроматография на гидроксилапатите

Мы достигли значительного успеха в очистке рецептора глюкагона после того, как обнаружили, что большинство белковых примесей (но не глюкагонсвязывающие белки) в буфере с низкой ионной силой адсорбируется на гидроксилапатите. Когда экстракты мембран с низким содержанием луброла или частично очищен-

ные препараты в 10 мМ *трис*-буфере наносили на маленькие колонки с гидроксилапатитом, менее 8% общего количества белка не адсорбировалось на них, причем фактически вся глюкагонсвязывающая активность элюировалась исходным буфером (рис. 11). Но даже едва заметное увеличение ионной силы исходного буфера, например при замене 10 мМ *трис*-буфера на 10 мМ фосфат,

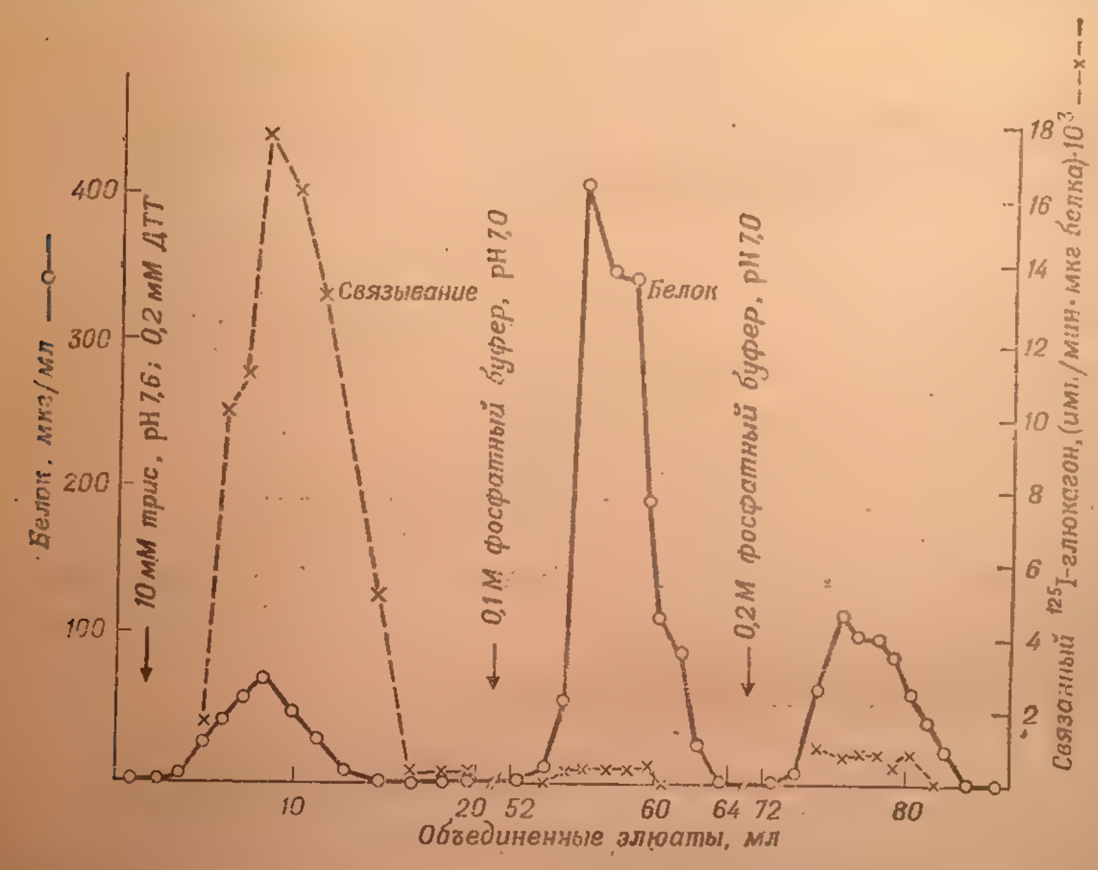



**Рис. 11.** Хроматография глюкагонсвязывающих белков (4,6 мг белка) из экстрактов мембран с низким содержанием луброла на колонке (0,9×10 см) с гидроксилапатитом, уравновешенным при 4° С 0,2 мМ дитиотрейтолом (ДТТ) в 10 мМ *трис*-буфере, рН 7,6. Смену буферов при элюции проводили, как указано на рисунке. Во фракциях элюата определяли белок (светлые кружки) и связывание с глюкагоном (крестики) [15].

вызывало элюцию белковых примесей, в результате чего удельная глюкагонсвязывающая активность элюата уменьшалась [10, 13].

Результаты очистки глюкагонсвязывающих белков в препаративных масштабах (табл. 2), показали, что использование гидроксилапатита приводит к увеличению удельной глюкагонсвязывающей активности в 40 раз. Если учесть полученное ранее 75-кратное увеличение активности за счет уменьшения концентрации луброла и осаждения белковых примесей, то с помощью трех стадий очистки достигается в среднем 3000-кратное увеличение связывания глюкагона по сравнению с активностью исходного экстракта мембран. Даже если удельную связывающую активность раство-

римых препаратов рецептора соотнести со связывающей активностью рецептора в препаратах частиц (около 0,02 пМ на 1 мг белка плазматических мембран печени; табл. 7, 9, 11), то общая очистка все равно остается 3000-кратной.

*Таблица 2*

**Очистка в препаративных масштабах глюкагонсвязывающих белков из плазматических мембран печени [15]**

| Свойства | Экстракт мембран в 0,5%-ном лубpоле | Экстракт мембран с низким содержанием луброла | Элюат с колонки гидроксилапатита |
|---|---|---|---|
| Общий белок, мг[1] | 41,4 | 37,3 | 0,26 |
| Связывающая способность, пМ/мг | 0,02 | 1,5 | 61,0 |
| Общая связывающая способность, пМ | 0,99 | 56,0 | 16,1 |
| Увеличение удельной связывающей активности | — | в 75 раз | в 3000 раз |

[1] Исходное количество белка плазматических мембран — 56,2 мг.

## V. СВОЙСТВА ЧАСТИЧНО ОЧИЩЕННЫХ ГЛЮКАГОНСВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

### А. Линейность связывания

Связывание глюкагона, определяемое по методу Хуммеля — Дрейера, было линейным в диапазоне от 0,25 до 1 мкг белка (рис. 12) при использовании материала, элюируемого с колонки гидроксилапатита 10 мМ *трис*-буфером (рис. 11). Когда этот буфер был замещен фосфатным буфером той же молярности, диапазон линейного связывания увеличился до 2 мкг элюированного белка (рис. 13).

### Б. Кинетика связывания

Аналогично результатам, полученным с интактными мембранами печени крыс [19], связывание глюкагона частично очищенными препаратами рецептора достигало равновесного состояния приблизительно через 25 мин (рис. 14). Эксперимент по связыванию выполняли таким образом (инкубация в течение 5 мин при 30° С и последующая гель-фильтрация при 4° С в течение 1—2 мин), что нельзя было получить первые точки, характеризующие кинетику процесса. По этой причине константы скорости ассоциации и диссоциации не рассчитывались. Следует объяснить, почему для определения связывающей способности солюбилизированных глюкагонсвязывающих белков мы использовали разработанную

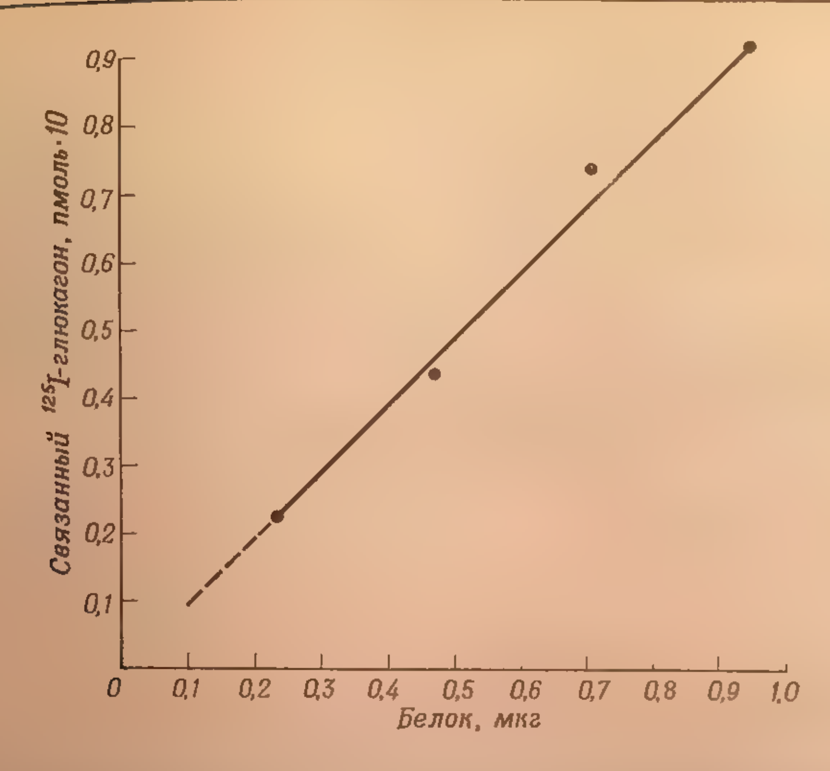



Рис. 12. Зависимость связывания $^{125}$I-глюкагона от количества частично очищенных белков; для элюции использовали тот же 10 мМ *трис*-буфер, что и в опыте результаты которого представлены на рис. 11 [15].

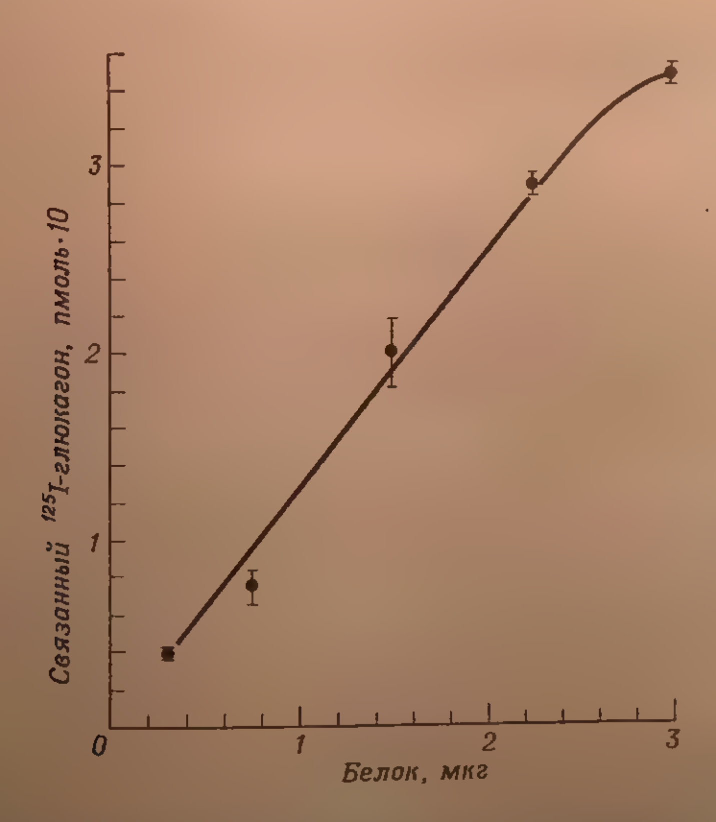



Рис. 13. Зависимость связывания $^{125}$I-глюкагона от количества частично очищенных белков; вместо 10 мМ *трис*-буфера при хроматографии на колонке с гидроксилапатитом использован 10 мМ фосфатный буфер (ср. с рис. 11).

Хуммелем и Дрейером [20] методику фильтрации этих белков через насыщенный лигандом гель. При определении связывания меченых $^{125}$I-глюкагона, секретина и вазоактивного полипептида кишечника (ВПК) возникают особые методические трудности; возможно, они объясняются уникальной амфипатической природой названных полипептидов — С-концевые участки молекул этих

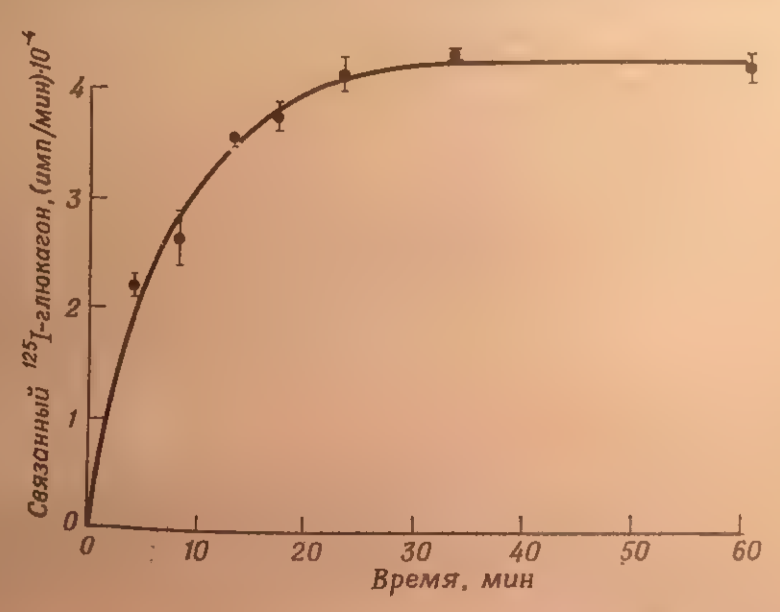



**Рис. 14.** Зависимость от времени инкубации связывания $^{125}$I-глюкагона частично очищенными препаратами рецептора (рис. 11) [15].

гормонов отличаются необычайно высоким содержанием гидрофобных аминокислотных остатков. Так, нам не удалось отделить свободный гормон от гормона, связанного с растворимым рецептором, путем пропускания раствора через целлюлозные и этилцеллюлозные фильтры (Millipore Corp. или Amersham-Searle's Oxcid filters). Предварительная обработка этих фильтров неспецифическими белками, например альбумином или релатином или большими количествами нативных гормонов, существенно не снижала высоких показателей для «слепых» проб, что обусловливалось связыванием фильтрами свободного меченого гормона [10]. Методы, в которых для осаждения связанного с рецептором гормона использовали полиэтиленгликоль [17] или для адсорбции комплекса — покрытый декстраном уголь [21], также оказались непригодными, поскольку значительные количества свободного $^{125}$I-глюкагона осаждались или адсорбировались вместе с комплексом.

## В. Обратимость связывания

$^{125}$I-глюкагон диссоциирует из комплекса с растворимым рецептором либо в условиях градиента концентрации, либо в результате обмена с нативным глюкагоном. Например, комплекс

$^{125}$I-глюкагона со связывающим белком был выделен из элюата, соответствующего свободному объему колонки с сефадексом G-50 (рис. 15, *А*). При рехроматографии аликвоты этого раствора на новой колонке с сефадексом G-50 появление несвязанного глюка-

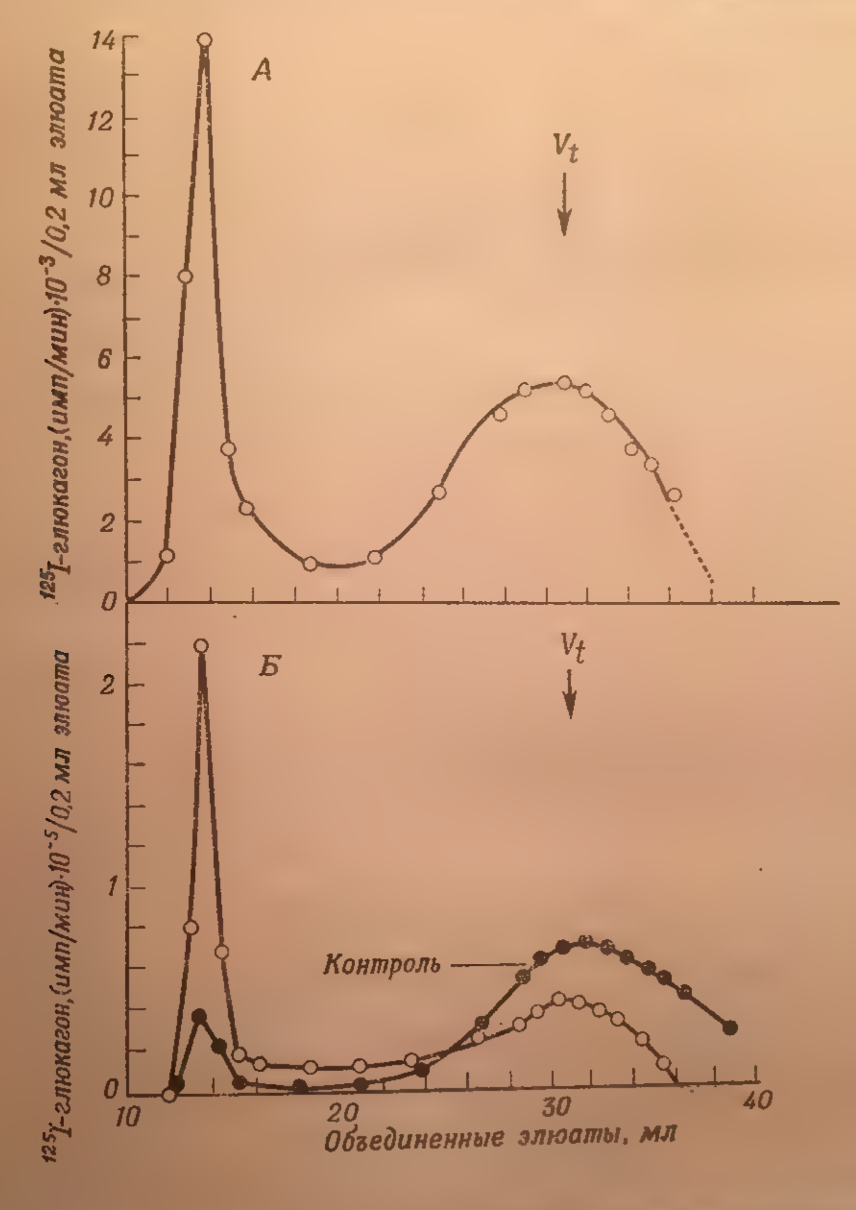



Рис. 15. Обратимость связывания. *А*. Частично очищенные связывающие белки (рис. 11) насыщали $^{125}$I-глюкагоном, а затем фильтровали через сефадекс G-50 для того, чтобы выделить их из фракций, соответствующих $V_0$ (светлые кружки). *Б*. Аликвоту этих объединенных фракций рехроматографировали в тех же условиях. В качестве контроля хроматографии подвергали и один $^{125}$I-глюкагон (темные кружки) [15].

гона во фракциях $V_t$ свидетельствовало о диссоциации комплекса (рис. 15, *Б*). Для интактных плазматических мембран печени характерно самопроизвольное освобождение $^{125}$I-глюкагона [19].

В экспериментах по замещению (табл. 3, эксперимент 2) было

показано, что нативный глюкагон вытесняет за 30 мин почти 60% связанного радиоактивного гормона. Нативный глюкагон добавляли в инкубационную среду в избыточных количествах и затем после преинкубации частично очищенного связывающего белка с $^{125}$I-глюкагоном определяли связывание. При удлинении периода замещения уровень обмена возрастает, но не превышает 75—80% даже после инкубации при 37° С в течение многих часов. Попытки использовать для усиления обмена повышенную температуру, например 50° С, оказались безуспешными.

### Г. Конкуренция между нативным глюкагоном и глюкагоном, меченным $^{125}$I

Если в начале инкубации в среду добавить нативный глюкагон в 100-кратном избытке, то ассоциация $^{125}$I-глюкагона с растворимым связывающим белком уменьшается более чем на 50% (табл. 3, эксперимент 1). Неполное подавление связывания

*Таблица 3*

**Эксперименты по конкурентному связыванию [15]**

| Номер эксперимента | Система | Связывание, имп/мин (после вычитания фона) |
|---|---|---|
| 1. | Связывающие белки [1] + $^{125}$I-глюкагон [2] | 23 138 |
| | То же + Нативный глюкагон [3] | 12 761 |
| 2. | Связывающие белки [1] + $^{125}$I-глюкагон [2] в течение 20 мин при 30° С | 23 020 |
| | То же + Нативный глюкагон [3] еще в течение 30 мин | 13 649 |

[1] 1,4 мкг белка.
[2] 0,3 нг.
[3] 30 нг.

$^{125}$I-глюкагона в присутствии большого избытка нативного гормона объяснить довольно трудно. Достаточно добавить 30—40-кратный избыток нативного глюкагона, чтобы фактически исключить связывание $^{125}$I-глюкагона препаратами частиц плазматических мембран печени крысы [19]. Возможно, по неизвестным пока причинам $^{125}$I-глюкагон преимущественно взаимодействует лишь с определенными растворимыми связывающими местами.

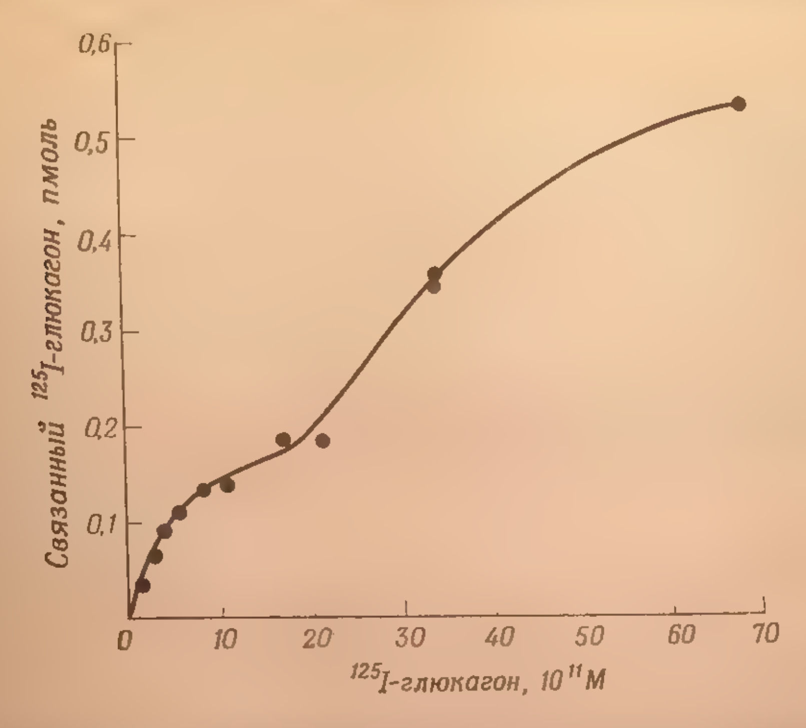



**Рис. 16.** Связывание $^{125}$I-глюкагона частично очищенными связывающими белками (рис. 11) в зависимости от концентрации гормона в элюирующем буфере. Связывание определяли по методу Хуммеля — Дрейера [10].

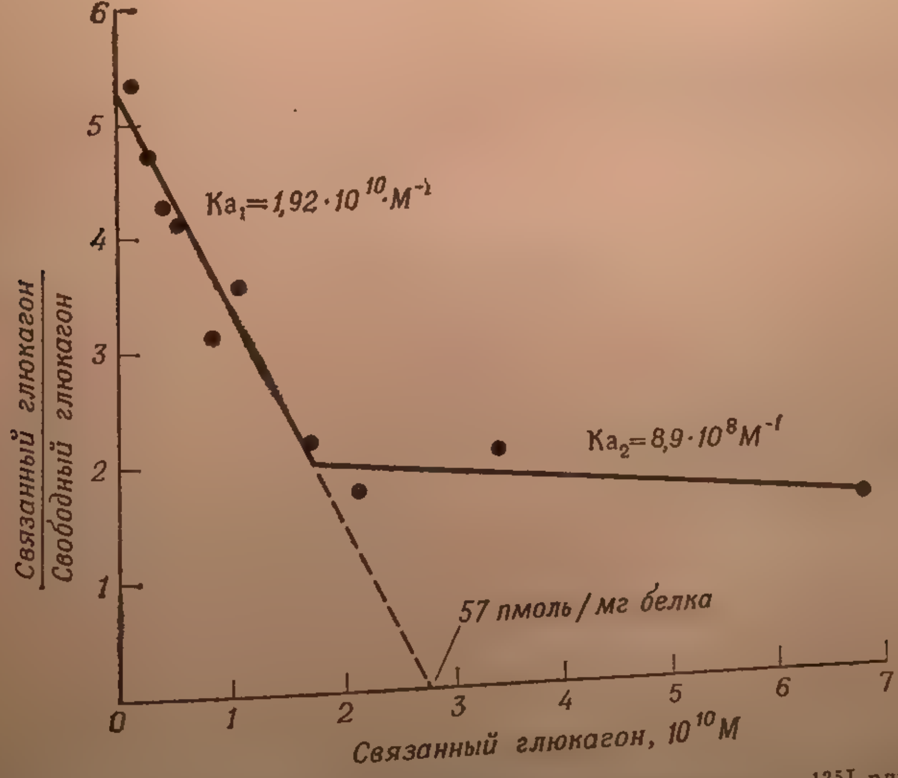



**Рис. 17.** График Скэтчарда для специфического связывания $^{125}$I-глюкагона частично очищенными (рис 11) связывающими белками [10].

### Д. Насыщаемость

Связывание $^{125}$I-глюкагона растворимыми препаратами плазматических мембран печени крысы, так же как и препаратами частиц [19], по-видимому, является насыщаемым процессом (рис. 16), причем в случае растворимых препаратов двухфазная кривая связывания свидетельствует о наличии более чем одного класса связывающих мест. Анализируя график Скэтчарда, представленный на рис. 17, можно сделать заключение о присутствии связывающих мест с высоким сродством и низкой емкостью, а также связывающих мест, которые, очевидно, имеют более низкое сродство, но очень высокую емкость и с трудом поддаются насыщению. В отличие от этих данных Родбелл и др. [19] обнаружили в препаратах частиц плазматических мембран печени только единственный тип глюкагонсвязывающих мест с константой ассоциации $10^{10}$ $M^{-1}$, т. е. равной соответствующей константе для мест с высоким сродством в растворимых препаратах. Как упоминалось ранее, Бирнбаумер и Пол [7] на основании изучения кинетики связывания пришли к выводу, что по крайней мере 80—90% специфических глюкагонсвязывающих мест в препаратах частиц плазматических мембран печени не принимают участия в активации аденилатциклазы и, следовательно, такие места не являются функциональными рецепторами. Учитывая эти данные, мы допускаем, что источником связывающих мест с низким сродством и высокой емкостью в растворимых препаратах служат подобные нефункциональные рецепторы в плазматических мембранах. Другое объяснение полученных данных состоит в том, что для мест с низким сродством и высокой емкостью характерно неспецифическое связывание, с которым часто приходится сталкиваться при изучении рецепторов полипептидных гормонов, особенно, если используются высокие концентрации лиганда [13, 22].

Предположение о наличии в наших экстрактах плазматических мембран двух различных глюкагонсвязывающих белков было сделано на том основании, что при пропускании экстрактов мембран с низким содержанием луброла через относительно мелкопористый гель можно выявить и отделить друг от друга две связывающие фракции (рис. 8 и 10). Однако с помощью физических методов пока еще не удалось разделить частично очищенную глюкагонсвязывающую белковую фракцию на более низкомолекулярные компоненты, которые сохраняли бы способность специфически связывать глюкагон.

### Е. Молекулярный вес и радиус Стокса

При фракционировании на 6%-ной агарозе насыщенного $^{125}$I-глюкагоном связывающего белка, очищенного с помощью гидроксилапатита, кривые элюции связывающего и общего белка были

симметричны (рис. 18). Основываясь на этих данных, путем сопоставления кривых элюции данного белка и ряда глобулярных белков-маркеров мы установили молекулярный вес глюкагонсвязывающего белка из печени крыс, который оказался равным приблизительно 188 000 (рис. 19). Интересно сравнить эту величину

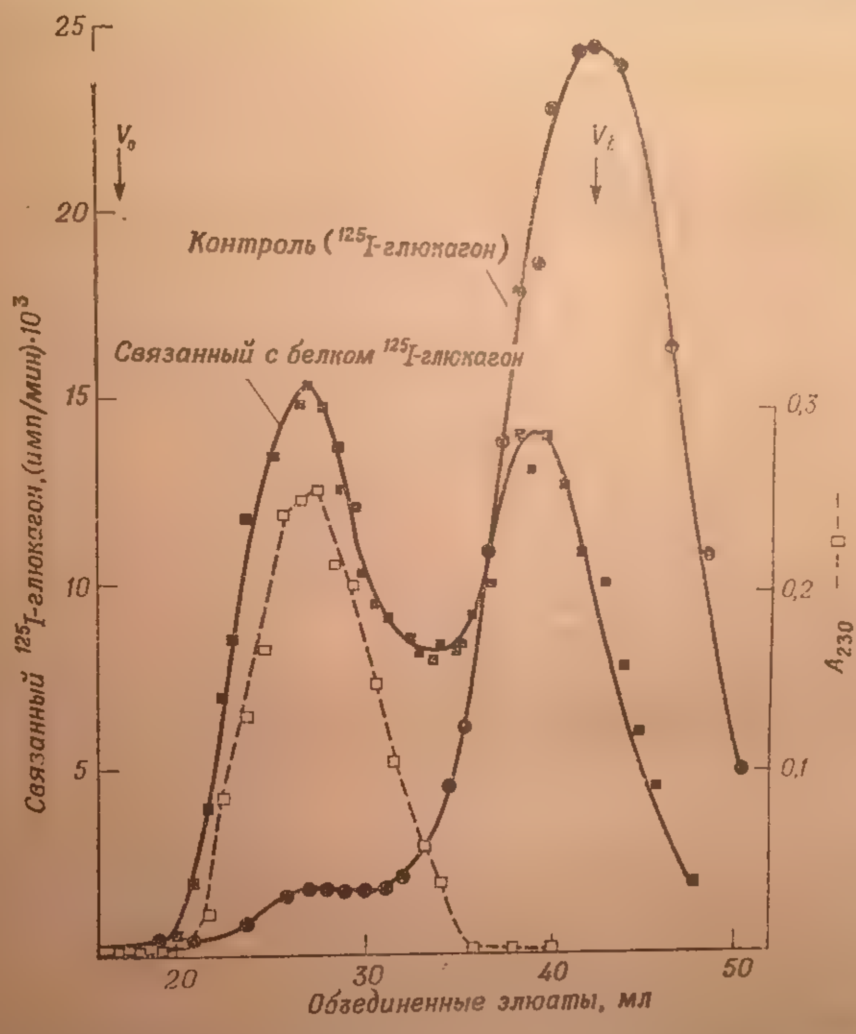



**Рис. 18.** Гель-фильтрация частично очищенных (рис. 11) глюкагонсвязывающих белков (272 мкг белка), насыщенных $^{125}$I-глюкагоном, на колонке с сефарозой 6В (1,5×28 см). Представлены кривые элюции связанного с белком $^{125}$I-глюкагона (темные квадраты), белка (светлые квадраты), а также $^{125}$I-глюкагона в отсутствие связывающего белка (темные кружки) [15].

с соответствующей величиной, приведенной Леви и др. [9] для солюбилизированного с помощью луброла препарата из миокарда кошки. Этот препарат, содержащий аденилатциклазу с мол. весом ~100 000—200 000, также связывает $^{125}$I-глюкагон. Данные же электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН [9] свидетельствуют о том, что глюкагонсвязывающий компонент имеет мол. вес ~26 000.

Предпринятые нами попытки использовать электрофорез в по-

лиакриламидном геле для идентификации глюкагонсвязывающих компонентов очищенного на гидроксилапатите материала оказались безуспешными: в процессе электрофореза $^{125}I$-глюкагон высвобождался из комплекса со связывающим белком даже в отсутствие ДСН.

Для очищенного на гидроксилапатите глюкагонсвязывающего белка радиус Стокса оказался равным приблизительно 42 Å, что было установлено путем сравнения кривых элюции на сефарозе

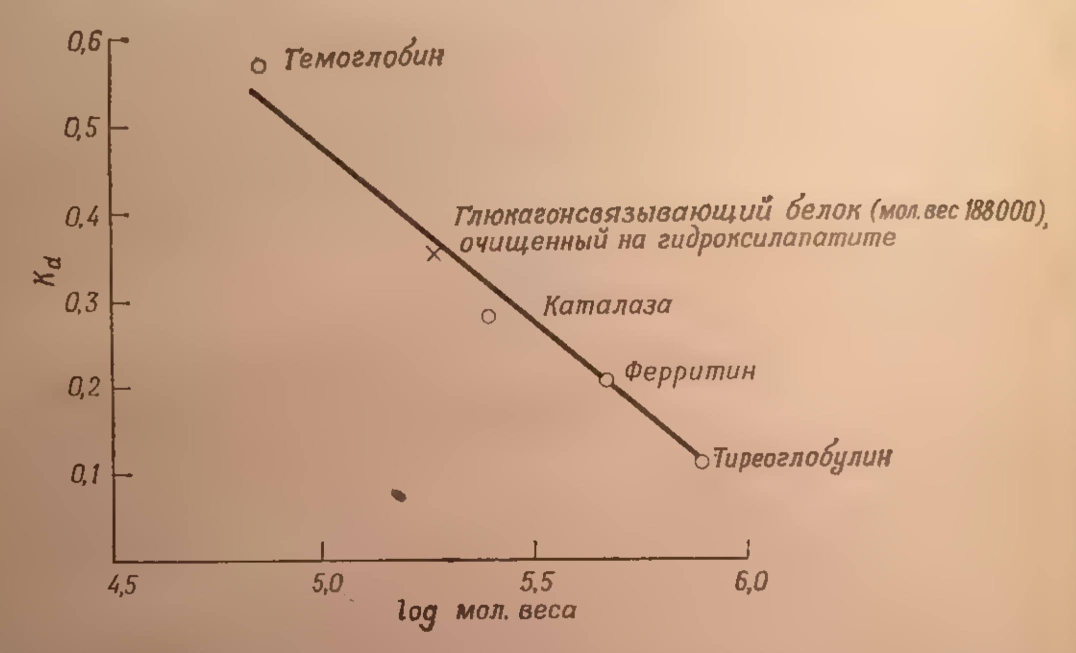
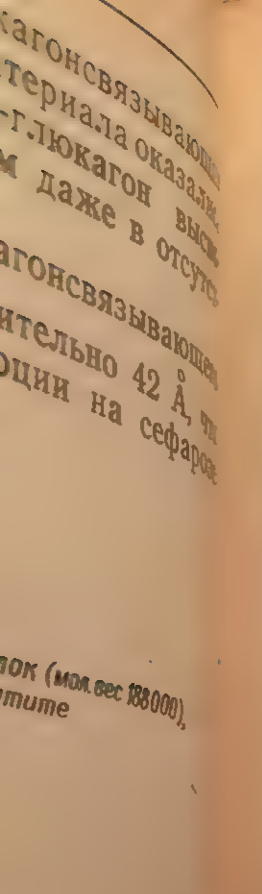



**Рис. 19.** Определение молекулярного веса частично очищенных (рис. 11) глюкагонсвязывающих белков с помощью гель-фильтрации на колонке с сефарозой 6В (ср. с рис. 18), прокалиброванной с помощью глобулярных белков-маркеров. Коэффициент распределения $K_d$ для белков вычисляли по формуле $K_d = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$, где $V_e$ — объем элюата, содержащего белок, $V_0$ — свободный объем колонки, а $V_t$ — объем, в котором элюируются соли [15].

6В данного белка и серии стандартных белков с известным радиусом Стокса (рис. 20).

Интересно сравнить полученные нами величины молекулярного веса и радиуса Стокса (185 000 и 42 Å соответственно) для глюкагонсвязывающего белка из печени с соответствующими значениями, найденными для других растворимых рецепторов мембран. Помимо молекулярного веса глюкагонсвязывающего белка из миокарда кошки [9] (26 000), известны молекулярный вес и радиус Стокса рецептора инсулина из печеночных и жировых клеток — соответственно 310 000 и 72 Å [17], а также молекулярный вес рецептора пролактина из молочной железы кролика, равный ~220 000 [23].



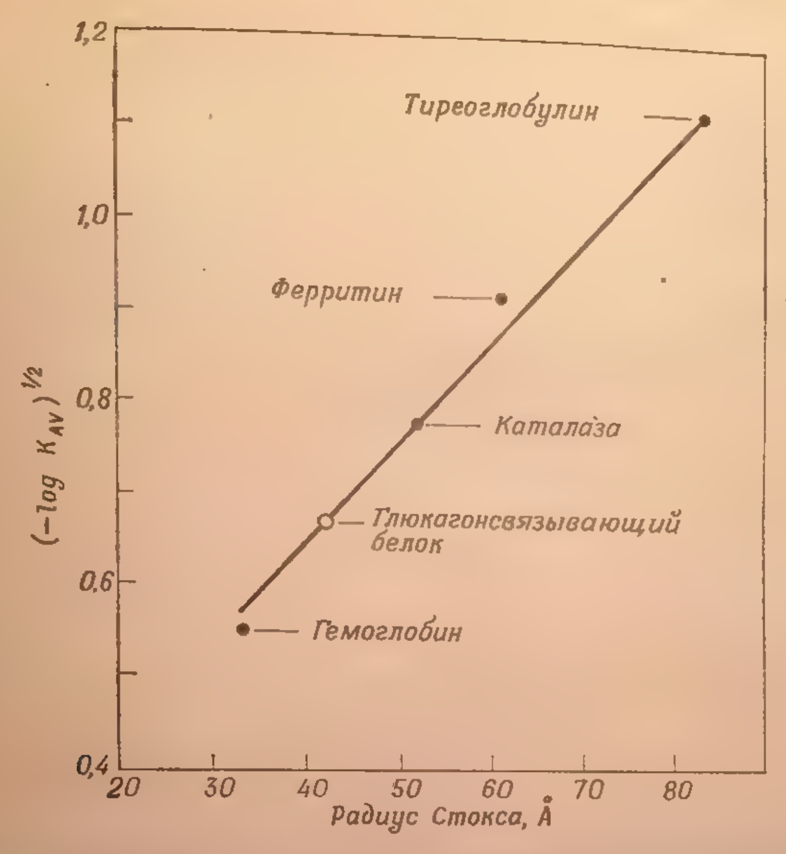



**Рис. 20.** Радиус Стокса растворимого глюкагонсвязывающего белка, рассчитанный на основании данных гель-фильтрации. Радиусы Стокса белков-маркеров взяты из справочника по биохимии (CRC Co., publishers). $K_{av}$ — зона выхода белка при элюции (коэффициент распределения) [10].

## Ж. Влияние луброла PX, мочевины и гуанидинхлорида на связывание глюкагона со связывающими белками, очищенными на гидроксилапатите

Как видно из представленных в табл. 4 данных, детергент в низких концентрациях оказывает значительный ингибирующий эффект на взаимодействие $^{125}$I-глюкагона со связывающими белками. При небольшой концентрации луброла PX ~0,01%, слегка превышающей КМК, связывание подавляется больше чем на 70%. При более высоких концентрациях детергента, которые использовались ранее при гель-фильтрации (табл. 1) и аффинной хроматографии [14], очищенные на гидроксилапатите белки теряют способность связывать глюкагон.

Гидрофобные растворители, отличные от неионных детергентов, также мешают связыванию. Мочевина и гуанидинхлорид резко тормозят связывание $^{125}$I-глюкагона с растворимыми препаратами рецептора (рис. 21). Кривая в форме гиперболы, как известно, описывает подавление взаимодействия лиганда с соответствующим связывающим белком; денатурация рецепторного белка графически была бы представлена плато с резким обрывом при денатурирующей концентрации реагента.

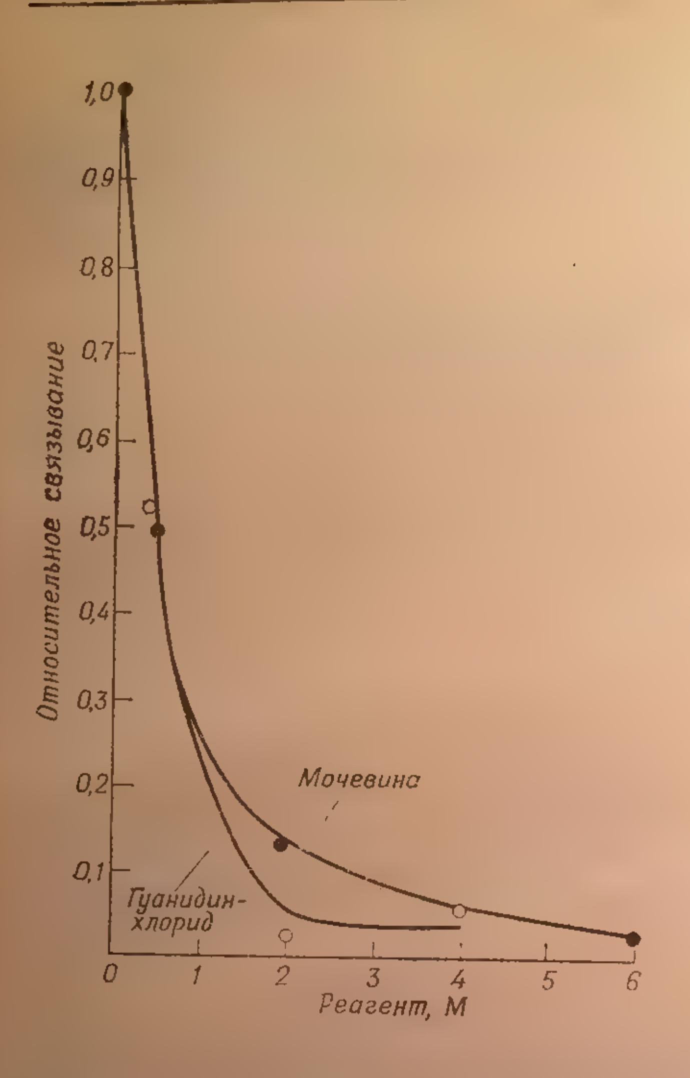



**Рис. 21.** Влияние гидрофобных растворителей на связывание $^{125}$I-глюкагона с растворимыми связывающими белками (8,5 мкг, рис. 11). При определении связывания по методу Хуммеля—Дрейера мочевину и гуанидинхлорид добавляли в элюирующий буфер в указанных концентрациях [10].

## 3. Состав глюкагонсвязывающих макромолекул

Концентрации луброла РХ в растворах глюкагонсвязывающего белка с низким содержанием детергента, первоначально рассчитанные на основании простого разведения, оказались менее 0,001% (табл. 1, 3-й столбец). Однако позднее при использовании $^{14}$С-луброла РХ было установлено, что концентрация детергента, удерживаемого на фильтрах Amicon, и в элюатах с колонки гидроксилапатита, фактически выше предсказанной (табл. 1, столбец 4). Так, например, элюаты с колонки гидроксилапатита, концентрированные на фильтрах Amicon, все еще содержали около 0,07% детергента, хотя его концентрация в используемой для определения связывания инкубационной среде уменьшалась до 0,003% (одной трети КМК). Поскольку количество детергента, удерживаемого на фильтрах Amicon, не снижалось ниже 0,12%, несмотря на повторные их промывания (табл. 1, эксперимент 1, стадия 2), а концентрация луброла в элюатах с колонки гидроксилапатита реально увеличивалась в процессе их концентрирования на фильтрах Amicon, становится очевидным, что луброл РХ прочно связывается с белками мембран и, возможно, соединяется с ними в оп-

ределенном соотношении. Поэтому вполне вероятно, что наши препараты частично очищенных глюкагонсвязывающих белков содержат существенные количества связанного луброла РХ, точная концентрация которого пока не установлена. В этой связи представляется интересным сообщение [24] о том, что даже очищенный препарат белкового рецептора ацетилхолина, солюбилизированного из мембран электрических пластинок рыб с помощью тритона Х-100, содержал свыше 20% (по весу) детергента. Хелениус и Симонс [25] также показали, что липофильные белки, выделенные из мембран, могут связывать до 70% (по весу) используемых для солюбилизации детергентов, тритона Х-100 и дезоксихолата. Кроме того, было отмечено, что ассоциация детергентов с мембранными белками выражена более резко в том случае, когда в смеси присутствует мембранный липид. Поэтому возможно, что липиды плазматических мембран остаются ассоциированными с частично очищенной фракцией глюкагонсвязывающих белков. Вместе с тем, поскольку обработка этой фракции фосфолипазами А и С не влияет на связывание глюкагона [10], ясно, что связанные фосфолипиды, даже если они и присутствуют, вероятно, не участвуют в рецепции.

Результаты предварительных экспериментов позволяют предполагать, что глюкагонсвязывающая макромолекула является гликопротеидом. Так, проба на углеводы с сульфофенолом оказалась положительной. С помощью количественного тиобарбитурового метода были определены свободные и связанные сиаловые кислоты, составляющие соответственно 1,2 и 11,3%, правда, максимум абсорбции хромофора лежал на 5 нм ниже, чем для чистой N-ацетилнейраминовой кислоты. Кроме того, во фракциях, очищенных на гидроксилапатите, удалось выявить два пятна, соответствующих восстановленным сахарам [10]. Эти фракции концентрировали, подкисляли и хроматографировали на бумаге. Сахара на хроматограмме проявляли аммиачным раствором азотнокислого серебра. По поводу анализа на сиаловые кислоты следует заметить, что если через небольшую колонку с несолюбилизированной

*Таблица 4*

**Влияние луброла РХ на ассоциацию глюкагона с очищенными связывающими белками [15]**

| Концентрация луброла в элюирующем буфере, % (вес/объем) | Связанный $^{125}$I-глюкагон, % от контроля |
|---|---|
| 0 | 100 |
| 0,01 | 27,5 |
| 0,05 | 3,3 |
| 0,10 | 1,0 |
| 0,50 | 0 |

нейраминидазой (агароза — нейраминидаза) пропускать элюаты, собранные после фракционирования на гидроксилапатите, то глюкагонсвязывающая активность рецептора остается без изменений.

*Таблица 5*

**Тканевая специфичность связывания глюкагона с солюбилизированными белками мембран [27]**

| Препараты после хроматографии на гидроксилапатите | Связывание $^{125}$I-глюкагона, имп/мин (после вычитания фона) |
|---|---|
| Плазматические мембраны печени крысы | 131 400 |
| Синаптические мембраны мозга крысы | 10 395 |
| Контроль (реактивы) | 11 133 |

## VI. ТКАНЕВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

О наличии тканевой специфичности у рецептора глюкагона свидетельствуют данные, представленные в табл. 5. Глюкагон не связывается ни синаптическими мембранами коры мозга крыс [26], ни экстрактами таких мембран, полученными в присутствии луброла тем же способом, каким обычно обрабатывают плазматические мембраны печени крыс [10]; вопрос о том, реагируют ли на глюкагон ткани мозга, пока не выяснен.

Эти эксперименты в какой-то степени убеждают в том, что луброл PX, сохраняющийся в полученных нами препаратах частично очищенных глюкагонсвязывающих белков, не может быть ответственным за обнаруживаемую связывающую активность. Такая точка зрения подкрепляется данными о влиянии на связывание добавленного луброла PX (табл. 4) мочевины и гуанидинхлорида (рис. 21), а также данными по расщеплению проназой препарата связывающего белка, активность которого за 1 ч уменьшается на 30% [27].

## VII. ГОРМОНАЛЬНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

### А. Связывание глюкагона и АКТГ

1. *Связывание с неочищенными экстрактами мембран.* Специфичность взаимодействия глюкагона с рецепторами плазматических мембран печени показана в эксперименте, приведенном на рис. 22. Прежде чем проводить связывание рецепторов мембран с $^{125}$I-глюкагоном, солюбилизацию и гель-фильтрацию, как описано выше (рис. 1), частицы мембран преинкубировали с высокими концентрациями нативного глюкагона (рис. 22, *А*) или нативного АКТГ (рис. 22, *Б*). После насыщения связывающих мест плазма-

тических мембран нативным глюкагоном ассоциация $^{125}$I-глюкагона со связывающими белками, элюируемыми в свободном объеме колонки с агарозой (рис. 22, *А*), подавлялась. В отличие от этого связывание радиоактивного глюкагона с рецепторами оставалось без изменений, если мембраны предварительно преинкубиро-

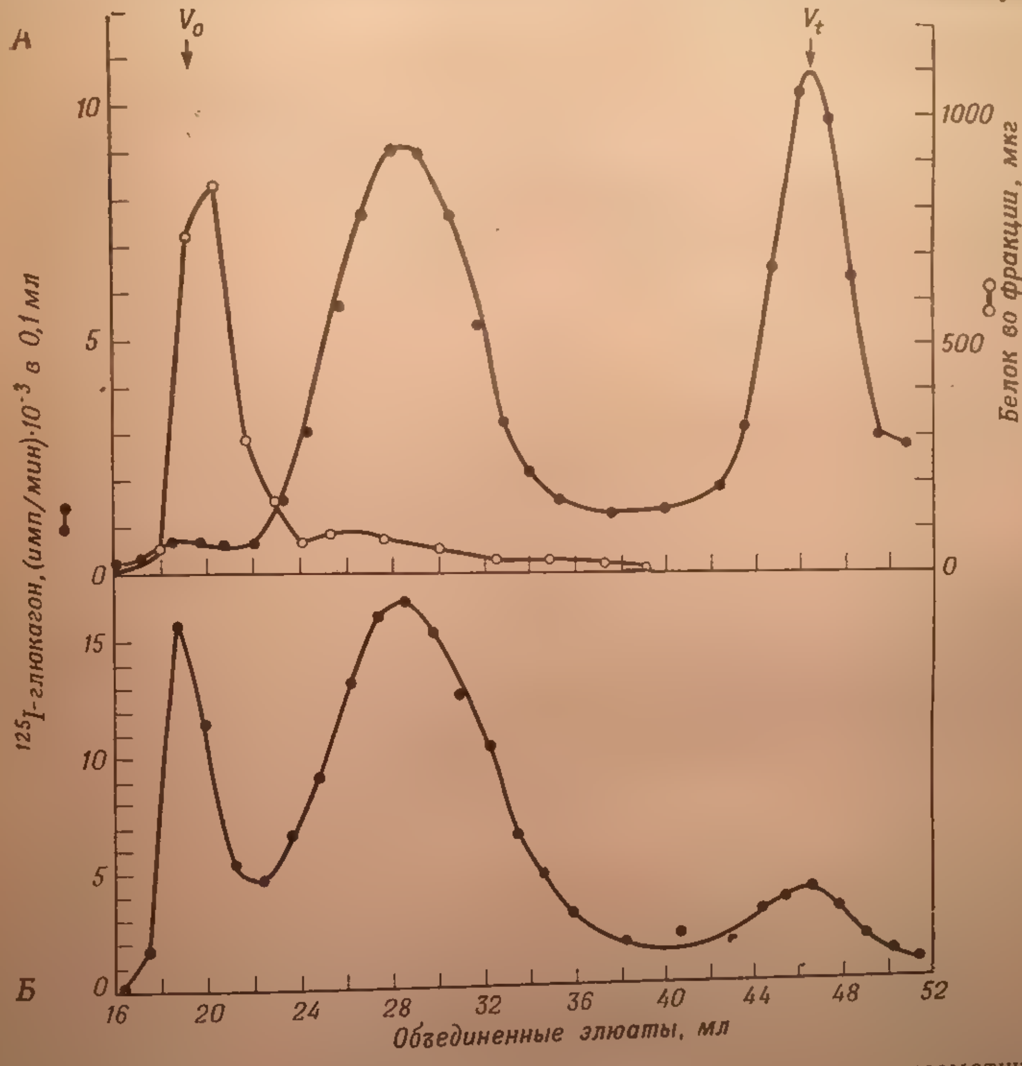



Рис. 22. Специфичность связывания глюкагона с рецепторами плазматических мембран. Плазматические мембраны инкубировали сначала с 50 мкг/мл нативного глюкагона (*А*) или АКТГ (*Б*), а затем с $^{125}$I-глюкагоном (4,2 нг/мл). После этого мембраны выделяли, отмывали от свободного несвязавшегося $^{125}$I-глюкагона и солюбилизировали. Экстракты хроматографировали в условиях, указанных в подписи к рис. 1 [15].

вали в растворах с высокими концентрациями АКТГ. Этот полипептидный гормон имеет приблизительно одинаковый с глюкагоном молекулярный вес, но не известно, действует ли он на печень (рис. 22, *Б*).

2. *Связывание с частично очищенными связывающими белками.* В серии экспериментов изучали связывание в сконцентрированных элюатах, полученных после фракционирования на колонке

с гидроксилапатитом, через которую пропускали буферы, содержащие в качестве связывающих лигандов $^{125}$I-глюкагон или $^{125}$I-АКТГ.

При использовании относительно мало очищенного связывающего белка (элюируемого с колонки 10 мМ фосфатным буфером, а не 10 мМ *трис*-буфером) никакого связывания АКТГ не наблюдали (табл. 6).

*Таблица 6*

**Специфичность связывания гормона с солюбилизированными белками плазматических мембран печени [15]**

| Гормон, меченный $^{125}$I | Связанный гормон, пмоль/мг белка |
|---|---|
| Глюкагон | 5,67 |
| Инсулин | 2,47 |
| АКТГ | 0 |

## Б. Связывание глюкагона и инсулина

В прямых и непрямых экспериментах было установлено, что, хотя глюкагон и инсулин связываются одними и теми же препаратами, для каждого из этих гормонов существуют свои отдельные неперекрывающиеся места связывания.

Мы показали, что $^{125}$I-глюкагон и $^{125}$I-инсулин связываются как фракцией частиц плазматических мембран печени (табл. 7), так и солюбилизированными частично очищенными молекулами рецептора (табл. 6 и 7).

В наших условиях связывание глюкагона всегда оказывалось выше, чем связывание инсулина; по-видимому, это является общей

*Таблица 7*

**Связывание инсулина и глюкагона с рецепторами плазматических мембран печени во фракции частиц и в солюбилизированных препаратах [13]**

| Гормон, меченный $^{125}$I ($10^{-10}$ М) | Нативный гормон ($10^{-7}$ М) | Связывание с фракцией частиц, фмоль/мг белка | Связывание с солюбилизированными препаратами, пмоль/мг белка |
|---|---|---|---|
| Глюкагон | — | 14,6 | 101,5 |
| Глюкагон | Глюкагон | 2,9 | 69,7 |
| Глюкагон | Инсулин | 16,1 | 110,6 |
| Инсулин | — | 13,7 | 86,7 |
| Инсулин | Инсулин | 6,5 | 57,9 |
| Инсулин | Глюкагон | 17,1 | 83,9 |

закономерностью, так как, согласно литературным данным, связывание глюкагона плазматическими мембранами печени превышает связывание инсулина в 1,5—200 раз в зависимости от типа препарата и лаборатории, в которой он был получен.

В экспериментах по конкурентному связыванию (табл. 7) показано, что инсулин не конкурирует за глюкагонсвязывающие места (и наоборот) как в нерастворимой, так и в солюбилизированной системах. Можно думать, что в результате солюбилизации и очистки плазматических мембран с помощью используемых в настоящее время методов глюкагон- и инсулинсвязывающие белки оказываются сосредоточенными в одних и тех же препаратах.

Об отсутствии конкуренции между глюкагоном и инсулином за связывание с рецептором косвенно свидетельствуют также данные, представленные в табл. 8. Из этих данных, полученных при изучении связывания указанных гормонов препаратами плазматических мембран печени, выделенных по методу Невилла, и последующем определении в них активности аденилатциклазы, ясно, что инсулин в концентрации, превышающей концентрацию глюкагона в 3 раза, не оказывает влияния ни на базальную, ни на стимулируемую глюкагоном активность фермента.

*Таблица 8*

**Влияние инсулина на базальную и стимулируемую глюкагоном активность аденилатциклазы в препаратах плазматических мембран печени, полученных по методу Невилла [13]**

| Система | Аденилатциклаза, нмоль цАМФ/мг белка·10 мин |
|---|---|
| Базальная | 0,345 |
| Глюкагон 0,287 мкМ | 1,94 |
| Инсулин 1,03 мкМ | 0,320 |
| Глюкагон + Инсулин | 2,00 |

Подобная точка зрения является спорной. Об ингибирующем действии инсулина на активность аденилатциклазы в плазматических мембранах печени грызунов (приготовленных с помощью политрона PT-10) и о подавлении инсулином активирующих воздействий на этот фермент глюкагона и адреналина поступили сообщения из двух лабораторий [28, 29]. Однако наши попытки воспроизвести описанные в этих сообщениях [28, 29] эксперименты неизменно оставались безуспешными. Более того, было показано, что инсулин не оказывает никакого влияния ни на базальную, ни на глюкагонстимулируемую активность аденилатциклазы в гомогенатах печени крысы и изолированных плазматических мембранах (табл. 8) [3, 30, 31].

## В. Связывание глюкагона, секретина и вазоактивного полипептида кишечника

Полипептидный гормон с широким спектром биологической активности, названный вазоактивным полипептидом кишечника (ВПК), был выделен из тонкого кишечника и химическим путем синтезирован [32]. ВПК содержит единственную цепь, состоящую из 28 аминокислотных остатков. 5-й и 8-й остатки этой цепи встречаются в тех же положениях соответственно в глюкагоне и секретине (полипептиде кишечника), а аминокислоты в положениях 5 и 7 ВПК химически подобны аминокислотам, находящимся в тех же положениях в глюкагоне и секретине (рис. 23, *А*, *Б*) [33]. Кроме того, ВПК, подобно глюкагону и секретину, является амфипатической молекулой, в С-концевом участке которой преобладают гидрофобные остатки (рис. 23, *Б*).

К отмеченному химическому и физическому сходству можно добавить, что некоторые биологические эффекты ВПК аналогичны эффектам глюкагона и секретина. Показано, что, подобно глюкагону, ВПК стимулирует образование глюкозы in vivo у собак и in vitro в срезах печени кролика [34], кишечную секрецию [35], а также сокращение миокарда у наркотизированных собак и в изолированных кусочках папиллярных мышц у кошки [36]; подобно секретину, ВПК стимулирует экзокринную панкреатическую секрецию [37], и, подобно этим двум гормонам, он стимулирует липолиз в изолированных жировых клетках придатка семенника и аденилатциклазу в мембранах этих клеток [38].

На основании этого мы полагаем, что ВПК и секретин взаимодействуют с рецепторами, содержащимися как во фракции частиц плазматических мембран печени, так и в солюбилизированных препаратах.

В экспериментах, данные которых приведены в табл. 9, оценивалась способность $^{125}$I-глюкагона и $^{125}$I-ВПК в концентрации $10^{-10}$ М связываться с частицами плазматических мембран и

*Таблица 9*

**Связывание глюкагона и ВПК с рецепторами плазматических мембран печени во фракции частиц и в солюбилизированных препаратах [13]**

| Гормон, меченный $^{125}$I ($10^{-10}$ М) | Нативный гормон ($10^{-7}$ М) | Связывание во фракции частиц, фмоль/мг белка | Связывание в солюбилизированных препаратах, пмоль/мг белка |
|---|---|---|---|
| Глюкагон | — | 26,3 | 49,1 |
| Глюкагон | Глюкагон | 5,3 | 16,9 |
| Глюкагон | ВПК | 22,6 | 61,0 |
| ВПК | — | 32,3 | 114,5 |
| ВПК | ВПК | 28,1 | 80,4 |
| ВПК | Глюкагон | 40,8 | 173,7 |

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Глюкагон | $H_3N^{(+)}$– | Гис | Сер | Глн | Гли | Тре | Фен | Тре | Сер | Асп | Тир | Сер | Лиз | Тир | Лей |
| Секретин | $H_3N^{(+)}$– | Гис | Сер | Асп | Гли | Тре | Фен | Тре | Сер | Глу | Лей | Сер | Арг | Лей | Арг |
| ВПК | $H_3N^{(+)}$– | Гис | Сер | Асп | Ала | Вал | Фен | Тре | Асп | Асн | Тир | Тре | Арг | Лей | Арг |
| ПИЖС | $H_3N^{(+)}$– | Гис | Сер | Глн | Гли | Тре | Фен | Тре | Сер | Асп | Тир | Сер | Иле | Ала | Мет |

| | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Глюкагон | Асп | Сер | Арг | Арг | Ала | Глн | Асп | Фен | Вал | Глн | Три | Лей | Мет | Асн | Тре | $-COO^{(-)}$ |
| Секретин | Асп | Сер | Ала | Арг | Лей | Глн | Арг | Лей | Лей | Глн | Гли | Лей | Вал | $-CONH_2$ | | |
| ВПК | Лиз | Глн | Мет | Ала | Вал | Лиз | Лиз | Тир | Лей | Асн | Сер | Иле | Лей | Асн | $-CONH_2$ | |
| ПИЖС | Асп | Лиз | Иле | Арг | Глн | Глн | Асп | Фен | Вал | Асп | Три | Лей | Ала | Глн | Глн | |

**Рис. 23**. Структура глюкагона, секретина и вазоактивного полипептида кишечника (ВПК). N-концевые участки молекулы показаны в верхней части рисунка, С-концевые — в нижней. Аминокислотные остатки, обладающие сильно выраженной гидрофобностью, изображены темными кружками, более слабой гидрофобностью — заштрихованными кружками; светлые кружки — гидрофильные остатки аминокислот. ПИЖС — полипептид, ингибирующий желудочную секрецию.

с частично очищенными (после фракционирования на колонках с гидроксилапатитом) растворимыми связывающими белками. Хотя радиоактивный ВПК связывался этими рецепторными препаратами так же хорошо и даже лучше, чем глюкагон, эксперименты по конкурентному связыванию, в которых нативные гормоны были использованы в высоких концентрациях ($10^{-7}$ М), показали, что нативный ВПК не конкурирует с $^{125}$I-глюкагоном и наоборот; следовательно, каждый гормон связывается своим рецептором.

К аналогичному выводу можно прийти на основании результатов параллельно проведенных экспериментов, в которых сравнивалось связывание глюкагона и секретина (табл. 10). Специфическое связывание $^{125}$I-секретина превышало связывание глюкагона как во фракции частиц, так и в растворимых препаратах. В экспериментах по конкурентному связыванию было показано, что нативный секретин в концентрации $10^{-7}$ М не конкурирует с $^{125}$I-глюкагоном в концентрации $10^{-10}$ М за связывающие места в указанных препаратах, т. е. эти гормоны, по-видимому, связываются различными рецепторными местами. В том случае, когда сравнивали секретин и ВПК (табл. 11), было обнаружено, что оба гормона связываются одним и тем же рецептором.

*Таблица 10*

**Связывание глюкагона и секретина рецепторами плазматических мембран печени во фракции частиц и в солюбилизированных препаратах [13]**

| Гормон, меченный $^{125}$I ($10^{-10}$ М) | Нативный гормон ($10^{-7}$ М) | Связывание во фракции частиц, фмоль/мг белка | Связывание в солюбилизированных препаратах, пмоль/мг белка |
|---|---|---|---|
| Глюкагон | — | 26,3 | 49,1 |
| Глюкагон | Глюкагон | 5,3 | 16,9 |
| Глюкагон | Секретин | 21,7 | 50,0 |
| Секретин | — | 91,9 | 115,8 |
| Секретин | Секретин | 0 | 56,1 |
| Секретин | Глюкагон | 13,2 | 74,5 |

Аналогичным образом мы сравнивали способность глюкагона, ВПК и секретина, каждого в отдельности или в различных сочетаниях, активировать аденилатциклазу в полученных по методу Невилла плазматических мембранах печени крыс. Глюкагон в концентрации 0,287 мкМ вызывал 6-кратное увеличение циклазной активности, тогда как ВПК и секретин в той же концентрации не давали подобного эффекта; для получения максимального (2—3-кратного) увеличения синтеза цАМФ требовалось увеличить концентрацию этих гормонов в 10 раз (табл. 12). На основании данных об аддитивности действия глюкагона плюс секретин и глюкагона плюс ВПК, а также об отсутствии аддитивности действия

*Таблица 11*

**Связывание секретина и ВПК рецепторами плазматических мембран печени во фракции частиц и в солюбилизированных препаратах [13]**

| Гормон, меченный $^{125}$I ($10^{-10}$М) | Нативный гормон ($10^{-7}$М) | Связывание во фракции частиц, фмоль/мг белка | Связывание в солюбилизированных препаратах, пмоль/мг белка |
|---|---|---|---|
| Секретин | — | 91,9 | 115,8 |
| Секретин | Секретин | 0 | 56,1 |
| Секретин | ВПК | 0 | 78,4 |
| ВПК | — | 32,3 | 114,5 |
| ВПК | ВПК | 18,1 | 80,4 |
| ВПК | Секретин | 12,7 | 72,4 |

секретина плюс ВПК (в этом случае цАМФ образуется не больше, чем под действием каждого из них) предполагают, что глюкагон, с одной стороны, и секретин вместе с ВПК, с другой, активируют различные аденилатциклазы.

Эти результаты можно сравнить с данными, полученными в двух других лабораториях, где работают с различными препаратами мембран клеток печени. Используя препараты частиц мембран печени, приготовленные с помощью политрона PT-10 и осаждения в пределах 1200 и 40 000 g, Дезбукуа и др. [38] показали, что в присутствии $10^{-7}$ М ВПК, $10^{-7}$ М глюкагона и $10^{-6}$ М секретина наблюдается максимальная стимуляция довольно низкой базальной удельной активности аденилатциклазы ($^{1}/_{10}$ обнаруживаемой в плазматических мембранах). Поскольку максимальные эффекты, наблюдаемые при совместном действии ВПК и глюкагона, а также секретина и глюкагона, но не ВПК и секретина, оказались аддитивными, был сделан вывод о том, что секретин и ВПК могут активировать общий фермент, который отличается от фермента, чувствительного к глюкагону [38]. Однако при непосредственном изучении конкурентного связывания меченных $^{125}$I и нативных полипептидов было установлено, что ВПК и секретин связываются общим рецептором, отличным от рецептора глюкагона [13], а потому нет основания допускать существование различных аденилатциклаз.

К подобному же заключению пришли Батай и др. [39] при изучении связывания в полученном по методу Невилла препарате плазматических мембран печени крыс. Прямые эксперименты по конкурентному связыванию меченных $^{125}$I и нативных глюкагона, ВПК и секретина показали, что оба полипептида кишечника связываются общим рецептором плазматических мембран печени, который отличается от рецептора глюкагона. Авторы не проводили сравнения относительной связывающей способности трех указанных гормонов, но они количественно охарактеризовали и сравнили

*Таблица 12*

**Влияние глюкагона, ВПК и секретина на активность аденилатциклазы плазматических мембран печени [13]**

| Система | Активность аденилатциклазы, нмоль цАМФ/мг белка·10 мин |
|---|---|
| Базальная | 0,345 |
| Глюкагон 0,287 мкМ | 1,94 |
| Секретин 0,284 мкМ | 0,378 |
| 2,84 мкМ | 0,715 |
| ВПК 0,262 мкМ | 0,412 |
| 2,62 мкМ | 0,914 |
| Глюкагон (0,287 мкМ) + Секретин (2,84 мкМ) | 2,64 |
| Глюкагон (0,287 мкМ)+ВПК (2,62 мкМ) | 2,35 |
| Секретин (0,284 мкМ)+ВПК (0,262 мкМ) | 0,412 |
| Секретин (2,84 мкМ)+ВПК (2,62 мкМ) | 0,776 |

их способность активировать аденилатциклазу плазматических мембран печени: максимальная стимуляция под действием ВПК составляла 15—20% стимуляции, вызываемой панкреатическим глюкагоном; секретин в этом плане не был изучен [39].

## Г. Связывание дегистидинглюкагона, N-ацетилглюкагона и N-метилглюкагона

Сообщалось, что дегистидинглюкагон не активирует чувствительную к глюкагону аденилатциклазу в полученных по методу Невилла плазматических препаратах печени, но конкурентно тормозит связывание $^{125}$I-глюкагона в этом препарате [40]. N-концевые фрагменты глюкагона (1—21, 1—23) и его С-концевые фрагменты (20—29, 22—29) не способны активировать циклазу, подавлять ответ фермента на глюкагон или конкурировать с меченым глюкагоном за рецептор [40]. Был сделан вывод, что N-концевой остаток гистидина в глюкагоне необходим для проявления биологической активности, а расположенная около С-конца (остатки 22—27) гидрофобная область ответственна за связывание глюкагона с рецепторами мембран. Поскольку кажущееся сродство к рецептору дегистидинглюкагона составляло только $^1/_6$ сродства нативного глюкагона [40], вероятно, N-концевой гистидин также принимает участие в связывании.

Эти данные побудили нас изучить связывание ряда производных глюкагона с частично очищенными препаратами белков, связывающих глюкагон.

*Таблица 13*

**Связывание дегистидинглюкагона с солюбилизированными связывающими белками плазматических мембран печени [13]**

| Гормон, меченный $^{125}$I ($2 \cdot 10^{-10}$М) | Конкурент ($2 \cdot 10^{-7}$М) | Связывание (связанный гормон / свободный гормон) |
|---|---|---|
| Глюкагон | — | 1,00 |
| | Глюкагон | 0,67 |
| | Дегистидинглюкагон | 0,85 |
| Дегистидинглюкагон | — | 0,69 |
| | Дегистидинглюкагон | 0,60 |
| | Глюкагон | 0,44 |

Как видно из данных табл. 13, где отношение связанного $^{125}$I-глюкагона к свободному меченому гормону является мерой связывания, сродство $^{125}$I-дегистидинглюкагона существенно ниже сродства $^{125}$I-глюкагона. Подтверждение этому было получено в экспериментах по конкурентному связыванию, которые показали, что немеченый дегистидинглюкагон по сравнению с нативным глюкагоном менее эффективно конкурирует с любым меченым полипептидом за связывание с растворимыми рецепторами.

*Таблица 14*

**Связывание ацетилглюкагона с солюбилизированными связывающими белками плазматических мембран печени [13]**

| Гормон, меченный $^{125}$I ($2 \cdot 10^{-10}$М) | Конкурент ($2 \cdot 10^{-7}$М) | Связывание (связанный гормон / свободный гормон) |
|---|---|---|
| Глюкагон | — | 1,00 |
| | Глюкагон | 0,47 |
| | N-ацетилглюкагон | 0,82 |
| N-ацетилглюкагон | — | 0,77 |
| | N-ацетилглюкагон | 0,67 |
| | Глюкагон | 0,63 |

Подобным образом были исследованы N-ацетилглюкагон (табл. 14) и N-метилглюкагон (табл. 15). Как было установлено в экспериментах по непосредственному определению связывания полипептидов, меченных $^{125}$I, и по конкурентному связыванию, оба производных связывались растворимыми рецепторами менее эффективно, чем глюкагон.

*Таблица 15*

**Связывание N-метилглюкагона с солюбилизированными связывающими белками плазматических мембран печени [13]**

| Гормон, меченный $^{125}$I ($2 \cdot 10^{-10}$M) | Конкурент ($2 \cdot 10^{-7}$M) | Связывание (связанный гормон / свободный гормон) |
|---|---|---|
| Глюкагон | — | 1,00 |
| | Глюкагон | 0,47 |
| | N-метилглюкагон | 0,68 |
| N-метилглюкагон | — | 0,51 |
| | N-метилглюкагон | 0,39 |
| | Глюкагон | 0,49 |

Из вышеприведенных данных следует, что снижение сродства связывания для глюкагона после удаления его единственного N-концевого гистидина было обнаружено и в опытах с препаратами частиц мембран печени [40]; правда, это снижение не было столь резко выражено, как при использовании растворимых рецепторов (соответственно 30 и 80%). Очевидно также, что две свободные аминогруппы глюкагона в единственном остатке гистидина в положении 1 и в единственном остатке лизина в положении 12 участвуют в связывании с растворимыми рецепторами, поскольку ацетилирование и метилирование этих аминогрупп уменьшают связывание соответственно на 23 и 49%.

## VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью неионного детергента луброла PX из очищенных методом Невилла плазматических мембран печени крыс экстрагируется глюкагонсвязывающий белок, обладающий свойствами гликопротеида. Связывающие белки можно идентифицировать в неочищенных и очищенных экстрактах, подвергая эти экстракты гель-фильтрации после предварительного (до или после экстракции) насыщения связывающих мест $^{125}$I-глюкагоном. Связывание определяют количественно, используя не более 250 нг частично очищенных связывающих белков, методом, в основу которого положен разработанный Хуммелем и Дрейером принцип насыщающей гель-фильтрации.

При гель-фильтрации $^{125}$I-глюкагона и $^{125}$I-инсулина в присутствии неионных (луброл PX и тритон X-100) и ионных (лизолецитин) детергентов в концентрациях, превышающих критическую мицеллярную концентрацию, обнаруживаются комплексы мицелл детергента с лигандом, кривая элюции которых сходна с кривой элюции комплекса лиганда со связывающим белком. За счет ис-

пользования таких процедур очистки, как осаждение белка при понижении концентрации детергента, гель-фильтрация и хроматография на гидроксилапатите, удельная глюкагонсвязывающая активность увеличивается в 3000 раз. Связывающие свойства глюкагонсвязывающего белка, мол. вес которого равен приблизительно 190 000, оказались в значительной степени сходными со свойствами препарата плазматических мембран: и в том, и в другом случае связывание было тканеспецифичным, быстрым, легко насыщаемым (по крайней мере для мест с высоким сродством, имеющим $K_a = 10^{10}$ $M^{-1}$) и спонтанно обратимым; нативный глюкагон обладает способностью вытеснять меченый гормон из комплекса с рецептором, а связывание тормозится агентами (лубролом PX, мочевиной, гуанидинхлоридом), препятствующими гидрофобным взаимодействиям лигандов с белками.

Исследования по специфичности связывания показали, что инсулин также связывается препаратами частиц плазматических мембран печени и очищенных связывающих белков, но связывающие макромолекулы в этом случае отличаются от макромолекул, связывающих глюкагон. АКТГ не связывается препаратами печени. Кроме того, инсулин не оказывал никакого действия ни на базальную, ни на глюкагонстимулируемую активность аденилатциклазы в препарате частиц плазматических мембран печени.

Вазоактивный полипептид кишечника (ВПК) и секретин связываются одними и теми же рецепторами как в препаратах частиц, так и в солюбилизированных очищенных препаратах. Однако эти рецепторы отличаются от рецепторов, связывающих глюкагон. ВПК и секретин способны активировать аденилатциклазу в препаратах частиц мембран, но в 10 раз менее эффективно, чем глюкагон. Максимальные эффекты ВПК и секретина усиливаются в присутствии глюкагона, однако аддитивности действия ВПК и секретина не наблюдается. Дегистидинглюкагон, N-ацетилглюкагон и N-метилглюкагон связываются с солюбилизированными глюкагонсвязывающими белками, но их сродство в результате химической модификации сильно понижается.

Обсудим кратко физиологическую природу описанных в данной главе глюкагонсвязывающих белков. Если «рецептор» определить как уникальную молекулу плазматических мембран, способную узнавать глюкагон и взаимодействовать с ним с высокой степенью сродства и специфичности, то выделенные нами макромолекулы можно считать истинными рецепторами. Если же считать, что определение «рецептора» включает также требование передачи сигнала о происшедшем взаимодействии другим метаболически важным молекулам, в данном случае аденилатциклазе, то выделенные нами глюкагонсвязывающие макромолекулы еще нельзя отнести к биологически значимым рецепторам. Действительно, хотя стимулируемая фтором аденилатциклаза обнаруживается в тех же экстрактах мембран с низким содержанием лубро-

ла, в которых присутствуют и глюкагонсвязывающие белки, этот фермент не активируется глюкагоном (или адреналином) даже после добавления фосфатидилсерина и этаноламина. Очевидно, растворимые белковые молекулы рецептора и аденилатциклазы в процессе экстракции и выделения постоянно диссоциируют. Поэтому, хотя мы и выделили макромолекулы, обладающие многими связывающими свойствами рецептора глюкагона, пока еще нет доказательств идентичности этих структур и истинного рецептора. Эти доказательства могут быть получены только на основании данных о сопряженности процессов связывания глюкагона и активации аденилатциклазы в одних и тех же мембранных препаратах.

**Благодарность**

Д-р К. Джонсон и д-р Н. А. Джорджио (младший) провели эксперименты, описанные в разд. II—VI; д-р В. Матт и д-р С. Саид любезно предоставили для экспериментов ВПК и секретин, д-р Ф. Сандби — дегистидинглюкагон, д-р Бивен — N-ацетил- и N-метилглюкагон, а д-р Дж. Леви — $^{14}C$-луброл РХ. Для выполнения этой работы Национальным институтом здравоохранения была выделена субсидия АМ-05475 END.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Neville D. M.*, Biochim. Biophys. Acta., *154*, 540 (1968).
2. *Emmelot P. Bos C. J., Benedetti E. L., Rumke P. H.*, Biochim. Biophys. Acta., *90*, 126 (1964).
3. *Pohl S. L., Birnbaumer L., Rodbell M.*, J. Biol. Chem., *246*, 1849 (1971).
4. *Rodbell M.*, Fed. Proc. *32* (8), 1854 (1973).
5. *Pohl S. L., Krans H. M. J., Birnbaumer L., Rodbell M.*, J. Biol. Chem., *247*, 2295 (1972).
6. *Pohl S. L., Krans H. M. J., Kozyreff V., Birnbaumer L., Rodbell M.*, J. Biol. Chem., *246*, 4447 (1971).
7. *Birnbaumer L., Pohl S. L.*, J. Biol. Chem., *248*, 2056 (1973).
8. *Levey G. S.*, Rec. Prog. Horm. Res., *29*, 361 (1973).
9. *Levey G. S., Fletcher M. A., Klein I., Ruiz E., Schenk A.*, J. Biol. Chem., *249*, 2665 (1974).
10. *Blecher M., Johnson C. B., Giorgio N. A.*, неопубликованные данные.
11. *Park C. R., Exton J. H.*, in: Glicagon (P. J. Lefebre and R. H. Unger, eds.), Pergamon Press, New York,1972, p. 77; Lefebre, P., ibid., p. 109.
12. *Swislocki N. J., Tierney J., Sonenberg M.*, Biochem. Biophys. Res. Sommun., *53*, 1109 (1973).
13. *Blecher M., Goldstein S.*, неопубликованные данные.
14. *Blecher M., Giorgio N. A., Johnson C. B.*, in: The Role of Membranes in Metabolic Regulation (M. A. Mehlman and R. W. Hanson, eds.), Academic Press, New York, 1972.
15. *Giorgio N. A., Johnson C. B., Blecher M.*, J. Biol. Chem., *249*, 428 (1974).
16. *Lewis M. S., Gottlieb M. H.*, Fed. Proc., *30* (3), 1459 (1971).
17. *Cuatrecasas P.*, Proc. Natl. Acad. Sci., *69*, 318 (1972); J. Biol. Chem., *247*, 1980 (1972).
18. *Goldstein S., Blecher M.*, in: Methods in Receptor Research (M. Blecher, ed.), Marcel Dekker, New York, 1976.

19. *Rodbell M., Krans H. M. J., Pohl S. L., Birnbaumer L.,* J. Biol. Chem., *246*, 1861 (1971).
20. *Hummel J. P., Dreyer W. J.,* Biochim. Biophys. Acta., *63*, 530 (1962).
21. *Korenman S. G.,* Endocrinology, *87*, 1119 (1973).
22. *Cuatrecasas P., Hollenberg M. D.,* Biochem. Biophys.. Res. Commun., *62*, 31 (1975).
23. *Shiu R. P. C., Friesen H. G.,* Abstract 168, Endocrine Society Meeting, Atlanta, 1974.
24. *Changeaux J. P.,* 9th International Congress of Biochemistry, Abstr. Ca 5, p. 442 (1973).
25. *Helenius A., Simons K., J.* Biol. Chem., *247*, 3656 (1972).
26. *Blecher M., Mennitt J. J.,* Abstract, Biochemistry/Biophysics 1974 Meeding, Minneapolis, Minn.
27. *Blecher M., Giorgio N. A., Johnson C. B.,* Adv. Enzyme Regul., *12*, 289 (1974).
28. *Illiano G., Cuatrecasas P.,* Science, *175*, 906 (1972).
29. *Hepp K. D.,* FEBS Lett., *12*, 263 (1971); Eur. J. Biochem., *31*, 266 (1972).
30. *Emmelot P., Bos C. J.,* Biochim. Biophys. Acta., *249*, 285 (1971).
31. *Thompson W. J., Williams R. H., Little S. A.,* Biochim. Biophys. Acta., *302*, 329 (1973).
32. *Said S. J., Mutt V., Science*, *169*, 1217 (1970); Eur. J. Biochem., *28*, 199 (1972).
33. *Bodanszky M., Klausner Y. S., Said S. J.,* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. *70*, 382 (1973).
34. *Kerins C., Said S. J.,* Proc. Soc. Exp. Biol. Med., *142*, 1014 (1972).
35. *Barbezat G. O., Grossman M. J.,* Science, *174*, 422 (1971).
36. *Said S. J., Bosher L. P., Spath J. A., Kontos H. A.,* Clin. Res., *20*, 29 (1972).
37. *Said S. J., Mutt V.,* Eur. J. Biochem., *28*, 199 (1972).
38. *Desbuquois B., Laudat M. H., Laudat P.,* Biochem. Biophys. Res. Commun., *53*, 1187 (1973).
39. *Bataille D., Freychet P., Rosselin G.,* Endocrinology, *95*, 713 (1974).
40. *Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S. L., Sundby F.,* Proc. Natl. Acad. Sci., *68*, 909 (1971).

# Глава 5

# ГОРМОНЫ ГИПОТАЛАМУСА И РЕЦЕПТОРЫ ГИПОФИЗА

*Ф. ЛАБРИ, Ж. ДРУЭН, А. ДЕ ЛИН, Л. ФЕРЛАН, Н. БАРДАН И А. БЕЛАНЖЕ*

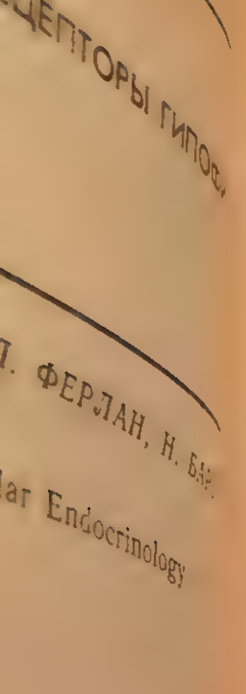
Medical Research Council Group in Molecular Endocrinology
**Centre Hospitalier de l'Université Laval**
Québec, Canada

## I. ВВЕДЕНИЕ

Передняя доля гипофиза секретирует шесть важнейших полипептидных гормонов: тиреотропный гормон (ТТГ), гормон роста (ГР), пролактин (Пр), лютеинизирующий гормон (ЛГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и адренокортикотропный гормон (АКТГ). Скорость секреции каждого гипофизарного гормона регулируется нейрогормонами, которые освобождаются из нервных окончаний в капилляры медиальной эминенции [1] и по сосудам портальной системы достигают места своего действия — аденогипофиза [23]. Как показано на рис. 1, секреция ЛГ, ФСГ и АКТГ находится под влиянием только стимуляторного воздействия гипоталамуса, тогда как секреция ГР, ТТГ и Пр, по-видимому, регулируется сбалансированным воздействием ингибиторных и стимуляторных нейрогормонов. Общее влияние гипоталамуса на секрецию ГР и ТТГ является стимуляторным, тогда как на секрецию Пр — ингибиторным.

Основные достижения в области нейроэндокринологии связаны с недавним установлением структуры трех регуляторных гормонов гипоталамуса, а именно гормона, стимулирующего освобождение ТТГ, или тиролиберина [4, 5], гормона, стимулирующего освобождение ЛГ, или люлиберина [6, 7] и соматостатина (гормона, ингибирующего освобождение ГР) [8, 9].

Эти гормоны имеют следующую первичную структуру: тиролиберин — пироГли-Гис-Про-$NH_2$; люлиберин — пироГлу-Гис-Три-Сер-Тир-Гли-Лей-Арг-Про-Гли-$NH_2$; соматостатин — Н-Ала-Гли-Цис-Лиз-Асн-Фен-Фен-Три-Лиз-Тре-Фен-Тре-Сер-Цис-ОН. Благодаря относительной легкости синтеза указанных пептидов и их аналогов в изучении механизма действия этих соединений открылись новые возможности и стали реальными чрезвычайно интересные исследования по установлению взаимосвязи их структуры и функции.





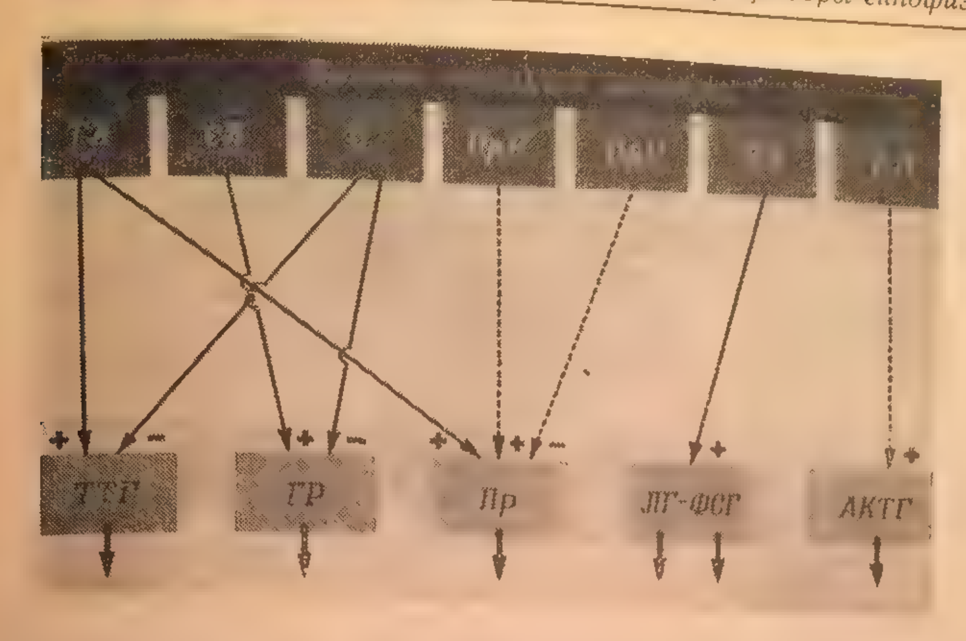



**Рис. 1.** Схематическое изображение гипоталамо-аденогипофизарного комплекса. ТТГ — тиреотропный гормон; ЛГ — лютеинизирующий гормон; АКТГ — адренокортикотропный гормон; ФСГ — фолликулостимулирующий гормон; ГР — гормон роста; Пр — пролактин; ТЛ — тиролиберин: СЛ — соматолиберин, КЛ — кортиколиберин; ПрС — пролактостатин; ЛЛ — люлиберин; С — соматостатин, гормон, ингибирующий освобождение гормона роста; ПрЛ — пролактолиберин.

## II. ВЛИЯНИЕ ТИРОЛИБЕРИНА, ЛЮЛИБЕРИНА И СОМАТОСТАТИНА НА НАКОПЛЕНИЕ цАМФ

Хотя на основании результатов эксперимента с теофиллином и производными цАМФ было выдвинуто предположение о функционировании циклических нуклеотидов в роли медиаторов действия регуляторных гипоталамических гормонов в передней доле гипофиза, четким доказательством участия аденилатциклазной системы может служить лишь установление изменения активности этого фермента или концентрации цАМФ в аденогипофизе под влиянием нейрогормонов. Такие данные уже получены для люлиберина [10—17] и соматостатина [17—19]. Добавление синтетического люлиберина к ткани аденогипофиза крыс in vitro приводит к параллельному увеличению содержания цАМФ и освобождению как ЛГ, так и ФСГ, причем оба эффекта зависят от продолжительности инкубации и концентрации добавленного декапептида [10, 14]. Более того, при использовании аналогов люлиберина, биологическая активность которых по отношению к его активности лежит в пределах от 0,001 до 500—1000%, в любых экспериментальных условиях обнаруживался тот же тесный параллелизм между стимуляцией накопления цАМФ в аденогипофизе и увеличением освобождения ЛГ и ФСГ [11]. Поскольку подобный эффект нейрогормона наблюдается в присутствии и в отсутствие теофиллина [10], можно считать, что действие люлиберина на

правлено на активацию аденилатциклазы, а не на подавление фосфодиэстеразы, разрушающей циклический нуклеотид.

В поисках более эффективных контрацептивных препаратов на основе ингибирующих аналогов люлиберина было синтезировано много производных этого пептида. Некоторые из них оказались мощными ингибиторами действия люлиберина как in vivo [20, 21], так и in vitro [22]. Благодаря доступности эффективных

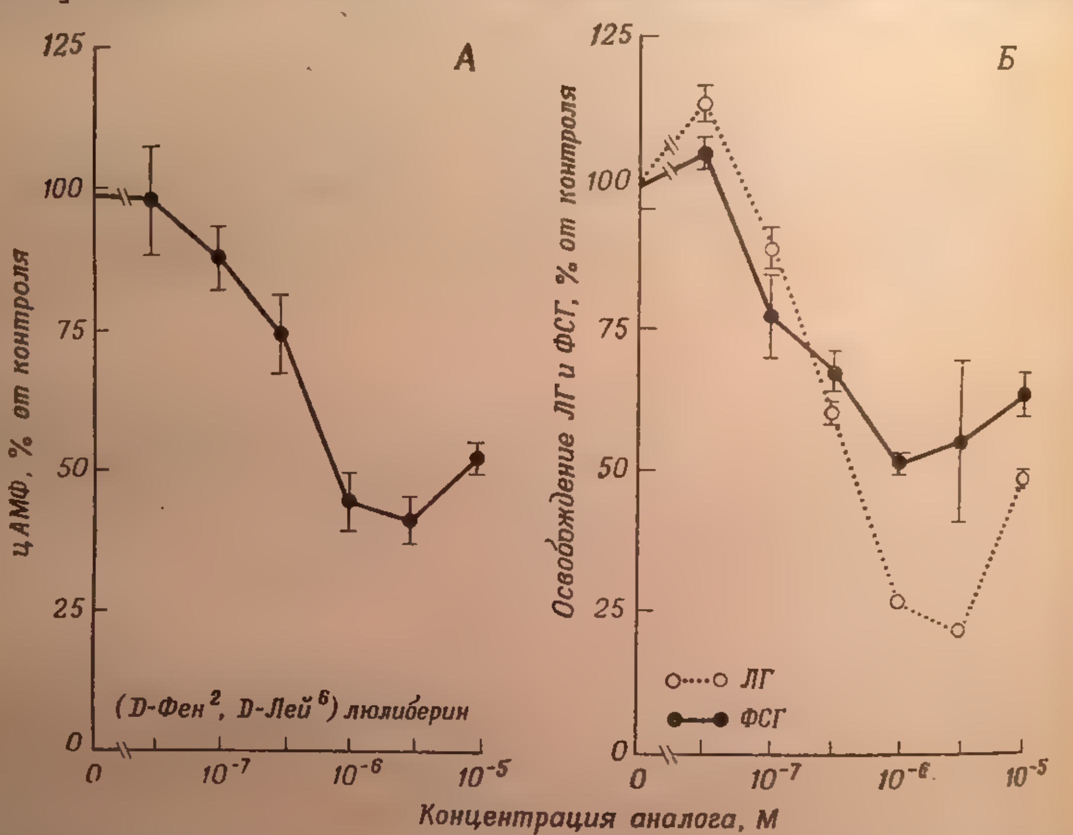



**Рис. 2.** Влияние (D-фен [2], D-Лей [6]) люлиберина в возрастающих концентрациях на накопление цАМФ, индуцируемое люлиберином в концентрации $3 \cdot 10^{-9}$ М (*А*), и освобождение ЛГ и ФСГ (*Б*) при инкубации половинок гипофизов крыс in vitro. Накопление цАМФ измеряли после 3,5 ч инкубации с аналогом, который добавляли на 10 мин раньше, чем люлиберин; освобождение ЛГ и ФСГ измеряли после 2,5-часовой инкубации, проведенной, как описано ранее [23].

антагонистов гормона можно попытаться выявить корреляцию между ингибирующими действиями этих антагонистов на индуцируемое люлиберином накопление цАМФ, с одной стороны, и освобождение ЛГ и ФСГ — с другой. Установление такой корреляции явилось бы дополнительным веским подтверждением функционирования цАМФ в роли медиатора освобождения ЛГ и ФСГ в передней доле гипофиза.

Используя монослойную культуру клеток аленогипофиза мы нашли [22], что индуцируемое люлиберином в концентрации $3 \cdot 10^{-9}$ М освобождение ЛГ на 50% тормозится добавлением (деГис², D-Ала⁶) люлиберина в концентрации $3 \cdot 10^{-6}$ М, этил-

амида (деГис$^{2}$, D-Ала$^{6}$, деГли-NH$_2^{10}$) люлиберина в концентрации $6 \cdot 10^{-6}$ М, (деГис$^{2}$, D-Лей$^{6}$) люлиберина в концентрации $4 \cdot 10^{-6}$ М, (D-Фен$^{2}$) люлиберина в концентрации $6 \cdot 10^{-6}$ М, пропиламида (деГис$^{2}$, деГли-NH$_2^{10}$) люлиберина в концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ М и (D-Фен$^{2}$, D-Лей$^{6}$) люлиберина в концентрации $10^{-7}$ М (М. Савари и Ф. Лабри, неопубликованные данные). Поскольку ни один из указанных аналогов не обладал значительной активностью люлиберина, эти пептиды были испытаны в данных экспериментах сначала в концентрациях, в 10 000 раз превышающих концентрацию люлиберина $5 \cdot 10^{-9}$ М. Все шесть антагонистов люлиберина вызывали заметное подавление индуцируемых этим гормоном накопления цАМФ (62,0 — 38,0%) и освобождения ЛГ (87,4 — 47,5%), а также ФСГ (75,4 –29,7%) [23]. В качестве примера параллельного подавления накопления цАМФ и освобождения ЛГ и ФСГ под действием антагонистов люлиберина на рис. 2 представлены данные о влиянии увеличения концентрации (D-Фен$^{2}$, D-Лей$^{6}$) люлиберина на накопление цАМФ и освобождение гормонов. Параллельное подавление накопления цАМФ и освобождение ЛГ и ФСГ обнаруживается также при молярном соотношении аналог/люлиберин в пределах от 100 до 3000. Для самого мощного из изученных ингибиторов (D-Фен$^{2}$, D-Фен$^{6}$) люлиберина эта величина равна 30 и выше. Такая явно выраженная корреляция между подавлением индуцируемых люлиберином накопления цАМФ и освобождения ЛГ и ФСГ служит дополнительным убедительным подтверждением уже имеющихся данных об обязательном участии аденилатциклазной системы в роли медиатора действия люлиберина в передней доле гипофиза.

Добавление тиролиберина к ткани аденогипофиза также приводит к увеличению, хотя и относительно небольшому, внутриклеточного уровня цАМФ, что сопровождается увеличением освобождения ТТГ [15, 17, 24]. Позднее было показано, что синтетический соматостатин вызывает быстрое угнетение накопления цАМФ в аденогипофизе in vitro [18, 19], причем этот эффект сопровождается заметным подавлением освобождения как ГР, так и ТТГ [18]. Влияние соматостатина на три отмеченных выше параметра наблюдалось в условиях базальной и индуцируемой простагландином $E_2$ или теофиллином секреции аденогипофизарных гормонов, что позволяет сделать предположение об ингибирующем действии пептида на активность аденилатциклазы.

Представленные данные четко показывают, что два стимулирующих гипоталамических гормона, тиролиберин и люлиберин, стимулируют накопление цАМФ и параллельно вызывают специфическое освобождение гормона, тогда как третий гормон — соматостатин, обладающий ингибиторным действием, угнетает накопление цАМФ, сопровождающееся уменьшением освобождения ГР и ТТГ. Эти данные служат убедительным аргументом в поль-

зу предположения о том, что в механизме действия трех названных пептидов в передней доли гипофиза участвует аденилатциклазная система.

## III. РЕЦЕПТОР ТИРОЛИБЕРИНА

### А. Введение

По аналогии с другими гормональными системами, в которых в качестве посредника выступает цАМФ [25], последовательность событий в действии тиролиберина предположительно должна быть такова: а) связывание тиролиберина со специфическим рецептором на наружной поверхности плазматической мембраны тиротрофов или маммотрофов и б) активация аденилатциклазы, приводящая к увеличению внутриклеточного уровня цАМФ с последующей активацией протеинкиназы, фосфорилированием белковых субстратов и изменением скоростей метаболических реакций, протекающих в клетке. Предположение о специфическом связывании $^3$H-тиролиберина с плазматическими мембранами клеток аденогипофиза как первичном этапе действия этого гормона в какой-то степени основывалось на результатах исследований с меченными радиоактивным иодом АКТГ [26, 27], ангиотензином [28] и глюкагоном [29—31]. Результаты этих исследований показали, что первой стадией в действии указанных полипептидных гормонов является взаимодействие их со специфическими местами узнавания плазматических мембран клеток-мишеней.

### Б. Очистка плазматических мембран клеток аденогипофиза

Используя модификацию метода Невилла, разработанного для очистки плазматических мембран печени крыс [32], мы описали [33] методику, которая позволяет одновременно выделить плазматические мембраны, неочищенную фракцию микросом и секреторные гранулы с высоким выходом соответственно 1, 2,5 и 10 мг белка на 1 г исходного количества ткани гипофиза.

Морфологические исследования показали, что материал, седиментирующий при ультрацентрифугировании в ступенчатом градиенте сахарозы в слоях с плотностями сахарозы 1,14—1,16 и 1,16—1,18 г/см$^3$, состоит исключительно из гладких мембран, свободных от других внутриклеточных компонентов. Во фракциях, морфологически идентифицированных как гладкие мембраны, обнаруживается 14-кратное увеличение 5′-нуклеотидазы [34, 35], поэтому данный фермент широко используется в качестве маркера плазматических мембран [36, 37]. Идентичность материала выделенной фракции плазматическим мембранам подтверждается также тем, что активность $Mg^{2+}$-зависимой $(Na^+, K^+)$-стимулируемой АТФазы в ней в 6—7 раз превышает соответствующую актив-

ность гомогената. Установлено, что этот фермент локализован в плазматических мембранах животных тканей [38, 39].

Фракция плазматических мембран обогащена также приблизительно в 10 раз аденилатциклазной активностью. Данные о локализации максимальной активности аденилатциклазы во фракциях плазматических мембран, выделенных из передней доли гипофиза, согласуется с аналогичными данными о локализации этого фермента в печени крыс [40], щитовидной железе быка [41] и эритроцитах лягушки [42].

### В. Характеристики связывания $^{3}$H-тиролиберина

Полумаксимальное связывание $^{3}$H-тиролиберина в очищенных плазматических мембранах из передней доли гипофиза быка [33] измеряли после 5 мин инкубации при 0° С [43]; кривая свя-

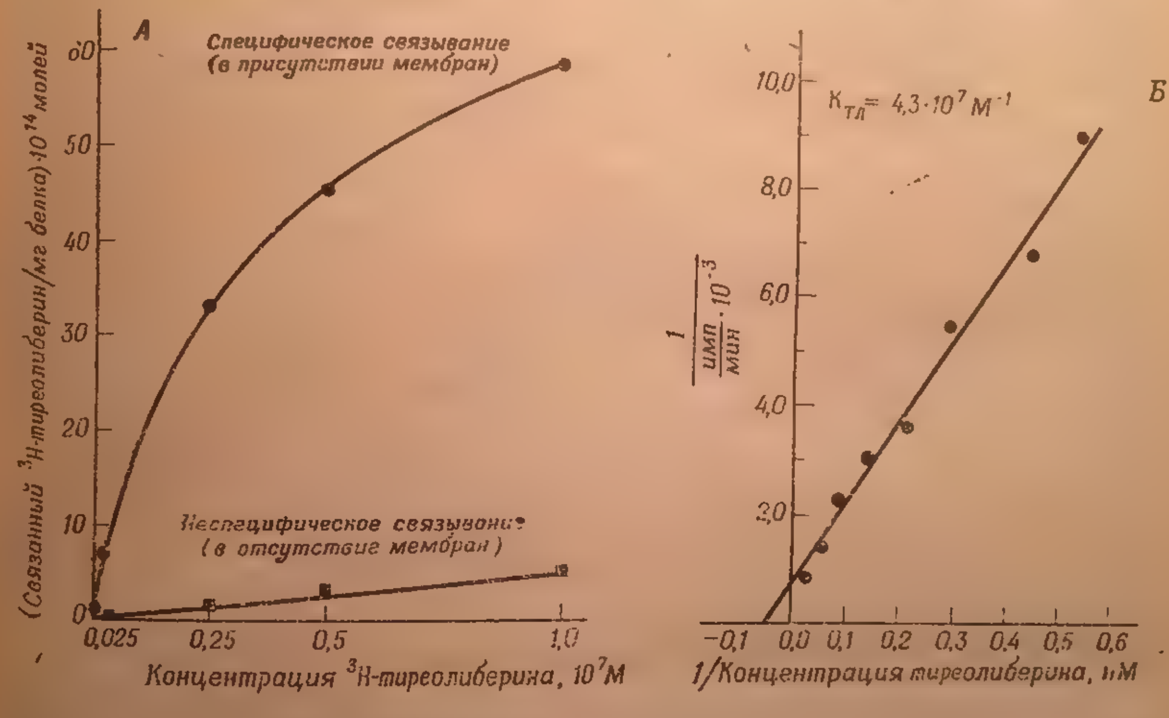



**Рис. 3.** *А.* Влияние $^{3}$H-тиролиберина в возрастающих концентрациях на связывание нейрогормона с плазматическими мембранами аденогипофиза в присутствии белка плазматических мембран (1 мг/мл). *Б.* График данных подобного эксперимента, построенный в обратных координатах.

зывания достигала плато через 30 мин. Как показано на рис. 3, взаимодействие тиролиберина с рецептором происходит в соответствии с кинетикой обычной бимолекулярной реакции, имеющей $K_d \sim 2{,}5 \cdot 10^{-8}$ М. Величины констант диссоциации для связывания тиролиберина с фракциями мембран, выделенными из опухоли гипофиза мыши, секретирующей ТТГ [44], и из опухоли гипофиза крысы, секретирующей Пр [45], оказались почти оди-

наковыми. На основании этих данных предполагают, что характеристики связывания рецепторов тиролиберина, ответственных за освобождение ТТГ и Пр в клетках различных типов, сходны или даже идентичны. Связывание обратимо, гормон-рецепторный комплекс диссоциирует после добавления избытка немеченого тиролиберина с начальным периодом полужизни 14±1 мин [43]. О высокой степени специфичности рецептора тиролиберина свидетельствует тот факт, что другие пептиды гипоталамического происхождения, а также другие полипептидные гормоны не конкурируют с тиролиберином за связывание [43].

Специфичность рецептора тиролиберина подтверждается также наличием тесной корреляции между способностью весьма различающихся по биологической активности аналогов тиролиберина подавлять связывание $^3H$-тиролиберина и стимулировать секрецию ТТГ [46] или Пр [47] соответственно в опухоли гипофиза мыши, секретирующей ТТГ, и в опухолевых клетках $GH_3$ аденогипофиза крыс.

В инкубируемых при 0° С клетках опухоли гипофиза, секретирующей ТТГ, обнаружено два класса связывающих мест с константами сродства $2 \cdot 10^{-8}$ и $5 \cdot 10^{-7}$ М [46]. Данные о существовании двух классов мест, связывающих $^3H$-тиролиберин, получены также для опухолевых клеток $GH_3$ гипофиза, содержащихся в культуре при 37° С [48]. Поскольку влияние тиролиберина на освобождение ТТГ in vitro обнаруживается при концентрациях гипоталамического гормона от $1 \cdot 10^{-9}$ до $1 \cdot 10^{-8}$ М [49], а при концентрациях выше $2{,}7 \cdot 10^{-9}$ М не происходит значительного увеличения освобождения Пр в клетках $GH_3$ [50], физиологическое значение связывающих мест с низким сродством еще предстоит установить. В клетках бычьего и крысиного аденогипофиза [43, 51] и в клетках $GH_3$ [45, 47] обнаружен только один класс связывающих мест с высоким сродством к тиролиберину.

### Г. Субклеточное распределение связанного $^3H$-тиролиберина

Связывание $^3H$-тиролиберина плазматическими мембранами, выделенными из ткани аденогипофиза быка [33], в 40 раз превышает связывание в гомогенате этой ткани [52]. В тринадцати субклеточных фракциях, полученных при дифференциальном и изопикническом центрифугировании ткани бычьего аденогипофиза, выявлено наличие тесной корреляции между связыванием $^3H$-тиролиберина, активностью аденилатциклазы и составом плазматических мембран, идентифицированных с помощью ферментов-маркеров и электронной микроскопии [33, 52]. После инкубации аденогипофизов крыс с $^3H$-тиролиберином высокая радиоактивность обнаруживается в частицах, осаждаемых при 10800 g [53]. Хотя в биологически значимое связывание с тиролиберином могут вовлекаться и некоторые внутриклеточные ре-

цепторы [48], очевидно, преобладающее число мест, связывающих этот гормон, судя по результатам связывания с выделенными субклеточными фракциями, локализовано в плазматических мембранах. Эти данные убедительно подтверждают предположение о том, что взаимодействие тиролиберина с рецепторами плазматических мембран является первой стадией в реализации данного гормонального эффекта и это взаимодействие, по-видимому, функционально взаимосвязано с активацией аденилатциклазы.

## Д. Роль липидов в связывании тиролиберина

Липиды мембран, как установлено, важны для реализации гормонального ответа в гормончувствительных аденилатциклазных системах, хотя ответ фермента на фтор после обработки мембран фосфолипазой или детергентами в основном остается без изменений [54, 55]. Полученные к настоящему времени данные указывают на возможное участие липидов либо во взаимодействии гормона с рецептором, либо в какой-то другой стадии между реакцией связывания и активацией аденилатциклазы, либо на обеих стадиях.

Обработка плазматических мембран аденогипофиза фосфолипазой А в концентрации до 10 мЕд/мл приводит к быстрой и почти полной потере тиролиберинсвязывающей активности [51]. После инкубации в течение 5 мин при 37° С с таким небольшим количеством фосфолипазы А, как 0,5 мЕд, в мембранах уменьшается содержание фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина соответственно на 30, 23 и 43%. Фосфатидилинозитол остается относительно нечувствительным к подобной обработке до тех пор, пока концентрация использованного фермента не достигнет 5 мЕд/мл, содержание сфингомиелина в этих условиях не изменяется. Аналогичным образом уменьшается связывание $^3$H-тиролиберина после обработки мембран фосфолипазой С, тогда как фосфолипаза D не оказывает на связывание никакого влияния [51].

Уменьшение связывания тиролиберина после обработки плазматических мембран фосфолипазой А или С обусловлено снижением сродства рецептора к этому гипоталамическому гормону. Действительно, концентрация тиролиберина, необходимая для полумаксимального связывания, возрастает с $3,5 \pm 0,5 \cdot 10^{-8}$ М [среднее значение ± стандартная ошибка (*m*) семи контрольных экспериментов] до $2,5 \cdot 10^{-6}$ и $5,0 \cdot 10^{-6}$ М после инкубации в течение 5 мин соответственно с 5 мЕд/мл фосфолипазы А и 10 мЕд/мл фосфолипазы С. Общее число связывающих мест в этих условиях не изменяется [51].

Как и в случае глюкагона [54, 55], эти наблюдения свидетельствуют о том, что фосфолипиды мембран необходимы для связывания тиролиберина с рецептором. Подобные исследования мо-

гут оказаться чрезвычайно важными для работ, связанных с очисткой компонентов, ответственных за узнавание гормона рецептором и передачу информации другим элементам аденилатциклазной системы.

## IV. ХАРАКТЕРИСТИКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ТИРОЛИБЕРИНА И СОМАТОСТАТИНА В КЛЕТКАХ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ

### А. Сходство функциональных рецепторов тиролиберина в клетках, секретирующих ТТГ и Пр

Поскольку тиролиберин стимулирует секрецию как ТТГ, так и Пр, интересно установить степень сходства рецепторов этого гормона в клетках двух различных типов. Используя плазматические мембраны, выделенные из аденогипофиза коровы в период лактации, когда количество клеток, секретирующих Пр, значительно превышает количество тиреотрофов, мы определили сродство рецептора к $^3$H-тиролиберину, оказавшееся равным $\sim 3 \times 10^{-8}$ М [43]. Почти идентичная $K_d$ для тиролиберина была найдена при использовании мембран, выделенных из опухолевых клеток, секретирующих Пр, ГР [45, 47] и ТТГ [44], а также гомогенатов аденогипофизов, полученных от крыс в различных физиологических состояниях [56]. При изучении конкурентного связывания было показано, что различные аналоги тиролиберина в равной степени вытесняют $^3$H-тиролиберин из комплекса с рецептором клеток $GH_3$, секретирующих Пр и ГР [47], и клеток опухоли гипофиза, секретирующих ТТГ [44]. Используя пять аналогов, величина биологической активности которых колебалась в широких пределах, Ривьер и Вэйл [57] нашли, что эти аналоги обладают почти одинаковой способностью вытеснять как ТТГ, так и Пр. Эти данные убеждают в том, что рецепторы тиролиберина в клетках, секретирующих ТТГ и Пр, очень сходны в отношении как сродства к гипоталамическому гормону, так и способности выражения специфического биологического ответа (способности освобождения гипофизарного гормона).

### Б. Сходство рецепторов соматостатина в клетках, секретирующих ГР, ТТГ и Пр

Соматостатин подавляет не только базальное освобождение ГР, но также и освобождение этого гормона, индуцируемое теофиллином, простагландином $E_2$, $N^6$-монобутирил-цАМФ и $N^6,2'$-O-дибутирил-цАМФ [18, 58, 59].

Не оказывая влияния на базальную секрецию ТТГ [60—62], соматостатин тем не менее заметно подавляет индуцируемое тиролиберином освобождение ТТГ in vitro [60, 61] и in vivo у крыс [60, 61] и у человека [62, 63]. Более того, под действием сомато-

статина в определенных экспериментальных условиях ингибируется также освобождение Пр в монослойной культуре клеток [60, 61], а у некоторых пациентов с акромегалией наблюдается частичное подавление исходного уровня Пр в плазме крови [64].

Помимо действия на уровне гипофиза, соматостатин, как сейчас установлено, подавляет секрецию инсулина [64—67], глюкагона [64, 68] и гастрина [69]. В связи с таким широким спектром действия соматостатина возникает вопрос о специфичности рецепторов этого тетрадекапептида в чувствительных клетках различных типов. Имея в своем распоряжении синтетические аналоги соматостатина, биологическая активность которых варьировала в широких пределах, мы изучили относительную способность этого гормона и его аналогов освобождать ГР, ТТГ и Пр в монослойной культуре клеток аденогипофиза крыс [70].

В опытах использовали соматостатин и два его аналога, активность которых в отношении освобождения ГР по сравнению с природным пептидом составляла соответственно 1 и 0,1%. Мы обнаружили, что исследованные пептиды почти идентично влияют на освобождение трех гормонов гипофиза: ГР, ТТГ и Пр. Соматостатин имел $ED_{50} = 3 \cdot 10^{-10}$ М, аналог I — $3 \cdot 10^{-8}$ М и аналог II — $2 \cdot 10^{-7}$ М. Эти данные указывают на значительное сходство функциональных рецепторов соматостатина в аденогипофизарных клетках трех типов: соматотрофах, тиреотрофах и маммотрофах.

Мы уже отмечали ранее, что соматостатин вызывает подавление как спонтанного освобождения ГР и Пр, так и освобождения ТТГ, индуцируемого тиролиберином [61]. Приведенные выше данные относительно пептидов, столь существенно различающихся по величине биологической активности, являются весьма веским доказательством близкого сходства функциональных рецепторов соматостатина в передней доле гипофиза.

## В. Характеристики взаимодействия тиролиберина и соматостатина

Существует предположение, что скорость секреции как ТТГ, так и Пр зависит в какой-то степени от относительных концентраций тиролиберина (стимулятора) и соматостатина (ингибитора) в крови портальной системы. Поэтому, как нам кажется, было бы интересно детально изучить влияние взаимодействия этих двух гипоталамических пептидов на секрецию ТТГ и Пр в культуре клеток гипофиза.

Как показано на рис. 4, *А*, соматостатин в концентрациях до $10^{-7}$ М не влияет на базальное освобождение ТТГ из аденогипофизарных клеток в монослойной культуре. Однако наблюдаемое в присутствии $10^{-8}$ М тиролиберина шестикратное увеличение освобождения ТТГ уменьшается приблизительно на 65% при до-

бавлении $10^{-8}$ М соматостатина, причем полумаксимальное подавление выявляется при концентрации соматостатина $2,5 \cdot 10^{-10}$ М.

С этими данными согласуются представленные на рис. 4, Б результаты экспериментов, в которых было показано, что соматостатин в концентрации $10^{-8}$ М подавляет индуцируемое $10^{-8}$—$10^{-7}$ М тиролиберином освобождение ТТГ приблизительно на

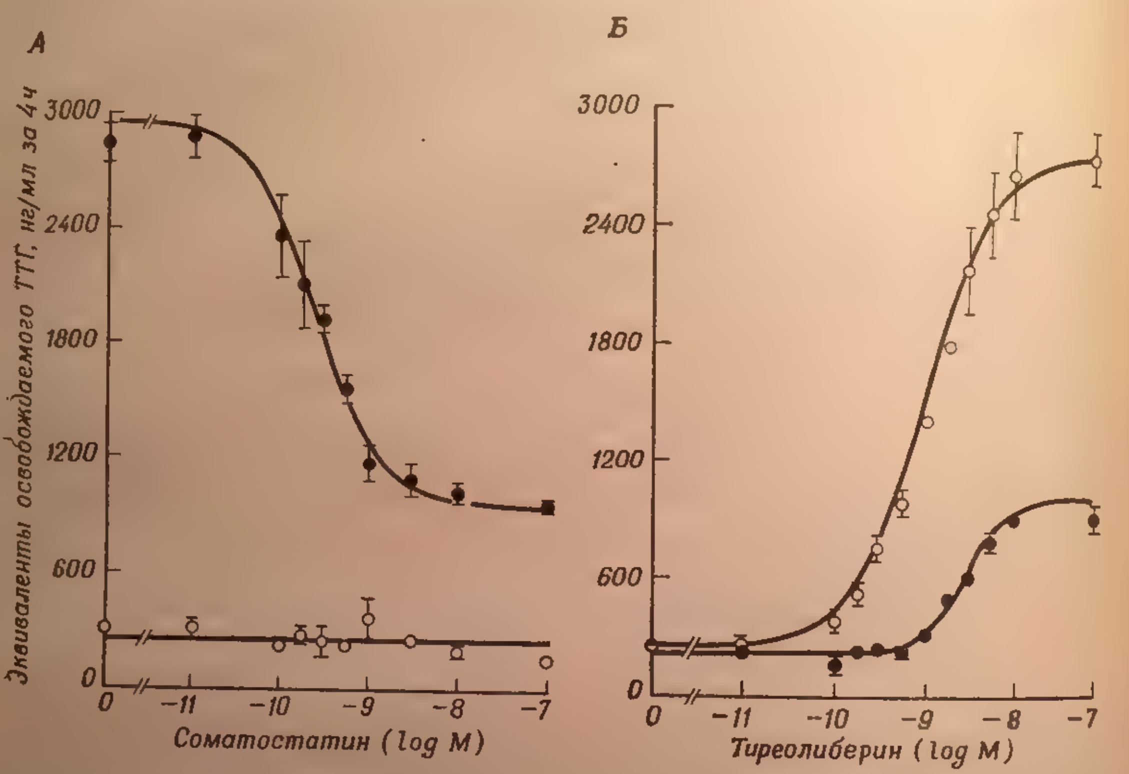



**Рис. 4.** *А*. Влияние соматостатина в возрастающих концентрациях на освобождение ТТГ в монослойной культуре клеток аденогипофиза самок крыс в отсутствие (светлые кружки) или в присутствии (темные кружки) $10^{-8}$ М тиролиберина. *Б*. Влияние тиролиберина в возрастающих концентрациях на освобождение ТТГ в отсутствие (светлые кружки) или в присутствии (темные кружки) $10^{-8}$ М самотостатина. Инкубацию в течение 4 ч и последующие измерения проводили, как описано [61].

30% по сравнению с максимальным ответом, полученным в отсутствие тетрадекапептида. На рис. 4, Б видно, что концентрация тиролиберина, приводящая к полумаксимальной стимуляции ($ED_{50}$) освобождения ТТГ в присутствии соматостатина, увеличивается лишь незначительно: с $1 \cdot 10^{-9}$ до $3 \cdot 10^{-9}$ М.

Было также найдено, что соматостатин в диапазоне концентраций от $3 \cdot 10^{-9}$ до $10^{-7}$ М подавляет базальное освобождение Пр в культуре аденогипофизарных клеток приблизительно на 60%; полумаксимальное подавление было выявлено при концентрации соматостатина $\sim 5 \cdot 10^{-10}$ М. Тетрадекапептид тормозил приблизительно на 50% также и освобождение Пр, наблюдаемое в присутствии $3 \cdot 10^{-9}$ или $10^{-7}$ М тиролиберина; полумаксимальное тор-

можение также выявлялось при концентрации соматостатина $\sim 5 \cdot 10^{-10}$ М. Как и в случае освобождения ТТГ, индуцируемого тиролиберином (рис. 4), соматостатин в используемых концентрациях вызывал неполное подавление освобождения Пр.

С учетом рассмотренных данных представлялось интересным изучить возможный эффект соматостатина на величину $ED_{50}$ для секреции Пр, стимулируемой тиролиберином. Как показано на

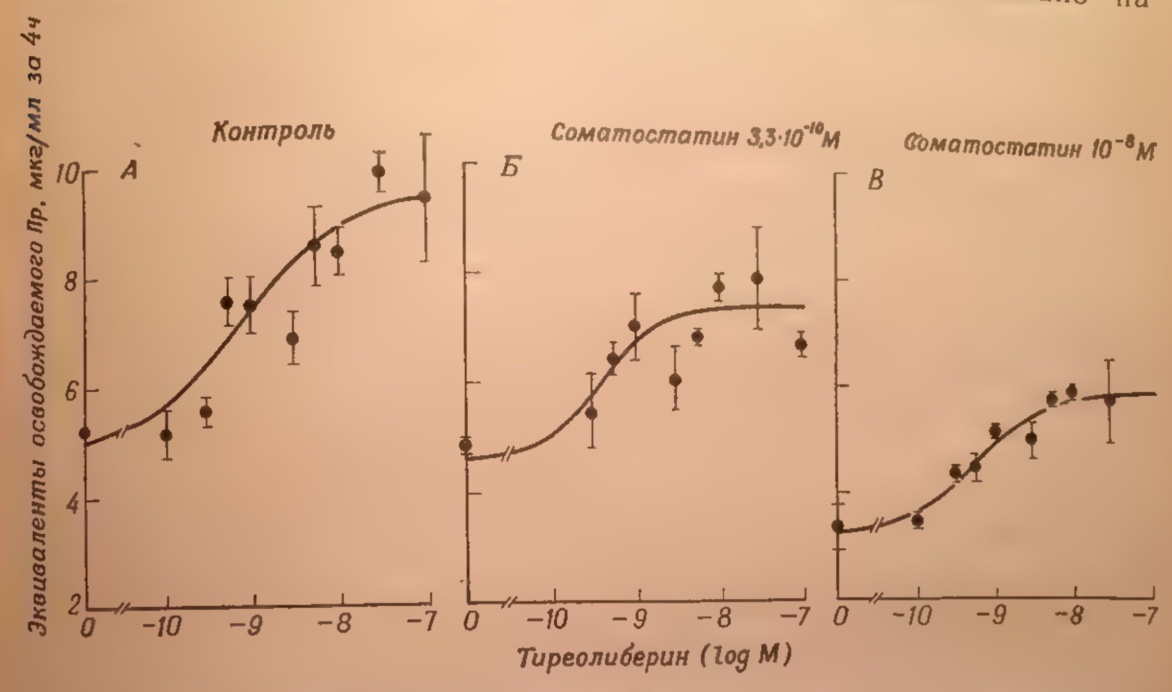



**Рис. 5.** Влияние возрастающих концентраций тиролиберина на освобождение Пр в культуре клеток аденогипофиза самок крыс в отсутствие (*А*) или в присутствии $3{,}3 \cdot 10^{-10}$М (*Б*) и $10^{-8}$М (*В*) соматостатина. Инкубацию и измерения проводили так же, как указано на рис. 4.

рис. 5, под действием соматостатина ($3 \cdot 10^{-10}$ и $10^{-8}$ М) наблюдается возрастающее торможение освобождения Пр и подавление максимального ответа на тиролиберин. Однако в присутствии соматостатина $ED_{50}$ для тиролиберина в отношении освобождения Пр остается без изменения.

Как показано на рис. 4, взаимодействие между тиролиберином и соматостатином в клетках, секретирующих ТТГ, не конкурентно, так как подавление освобождения ТТГ устраняется только на 30% в присутствии 10-кратного молярного избытка тиролиберина и, что более убедительно, при добавлении $10^{-8}$ М соматостатина $ED_{50}$ для тиролиберина в отношении стимуляции освобождения ТТГ увеличивается незначительно (рис. 4). Данные рис. 5 также указывают на неконкурентный тип взаимодействия между этими двумя пептидами в маммотрофах.

Мы уже обнаружили ранее, что тиролиберин стимулирует [15], тогда как соматостатин тормозит [15, 18] накопление цАМФ

в ткани аденогипофиза. Принимая во внимание ассоциацию рецепторов тиролиберина, по крайней мере значительного их большинства, с плазматическими мембранами [43, 52], в которых также локализована аденилатциклаза [33], представляется весьма вероятным, что первой стадией в действии этих двух пептидов является связывание со специфическими рецепторами, расположенными на наружной поверхности плазматических мембран; в результате такого связывания происходит активация (для тиролиберина) или ингибирование (для соматостатина) аденилатциклазы.

Данные о неполном торможении соматостатином освобождения ТТГ, индуцируемого тиролиберином (рис. 4), позволяют предположить, что в тиреотрофах рецепторов соматостатина меньше, чем рецепторов тиролиберина, и (или) что существуют два класса функциональных рецепторов для соматостатина и (или) тиролиберина. Если допустить наличие различных популяций рецепторов соматостатина, то в этом случае определенная часть соматостатин-рецепторных комплексов могла бы устранить действие тиролиберин-рецепторных комплексов, чем объяснялось бы 70%-ное подавление ответа на тиролиберин; как можно представить, остальная часть рецепторов соматостатина была бы не способна эффективно конкурировать с единственной популяцией рецепторов тиролиберина, чем объяснялся бы эффект тиролиберина в присутствии соматостатина. Возможно также наличие двух популяций рецепторов тиролиберина. В этом случае можно допустить, что одни рецепторы тиролиберина имеют механизм сопряжения, менее эффективный, чем соответствующий механизм рецепторов соматостатина, и этим объяснялось бы 70%-ное подавление секреции ТТГ в присутствии тетрадекапептида; другие же рецепторы тиролиберина могли бы иметь сопрягающий механизм, более эффективный, чем у соматостатина, и этим объяснялось бы отсутствие полного устранения влияния тиролиберина на освобождение ТТГ под действием избытка соматостатина. Отсутствие ингибирующего действия соматостатина на базальное освобождение ТТГ, возможно, обусловлено неспособностью соматостатин-рецепторных комплексов подавлять активность того минимального числа молекул аденилатциклазы, которое требуется для базального освобождения гормона.

В клетках, секретирующих Пр, соматостатин подавляет базальное освобождение Пр на 50—60%, и в присутствии тиролиберина подавление также неполное (~50%). Поскольку стимуляция освобождения Пр под влиянием тиролиберина мала, вполне возможно, что ингибирующий эффект соматостатина в присутствии тиролиберина является вторичным по отношению к подавлению базального освобождения Пр. Как и в случае тиреотрофов, эти данные указывают либо на повышенное число рецепторов тиролиберина в маммотрофах по сравнению с рецеп-

торами соматостатина, либо на увеличение эффективности сопряжения рецепторов тиролиберина с последующими механизмами, обеспечивающими выражение клеточной функции (освобождение Пр).

## V. МОДУЛЯЦИЯ УРОВНЯ РЕЦЕПТОРОВ

Изучение рецепторов показало, что для полной активности аденилатциклазы достаточно связывания лишь небольшой части клеточных рецепторов [71]. Эти наблюдения позволили предположить, что изменение числа рецепторов может оказаться важным моментом в регуляции клеточной активности. Согласно такому допущению, в случае увеличения числа связывающих мест клетка отвечает на гормон при более низкой концентрации циркулирующего гормона, тогда как в случае уменьшения числа связывающих мест для того же ответа потребовалась бы более высокая концентрация гормона.

У крыс с гипофункцией щитовидной железы, индуцированной длительной обработкой пропилурацилом, число мест, связывающих тиролиберин, в гипофизе увеличивается по сравнению с контролем приблизительно в два раза, а после обработки гормоном щитовидной железы уменьшается [53, 56]. В экспериментальных условиях, приводящих к заметной стимуляции секреции Пр (введение эстрадиола самцам крыс), число связывающих мест в гипофизе увеличивается в 2—3 раза (рис. 6). В этих условиях число связывающих мест заметно меняется, тогда как сродство рецептора к нейрогормону остается прежним.

На рис. 7 графически показано влияние тестостерона на кажущуюся $K_M$ стимуляции ($ED_{50}$) освобождения ЛГ под действием люлиберина в культуре клеток гипофиза. Можно видеть, что в клетках, предварительно инкубированных с тестостероном в течение 36 ч, $ED_{50}$ люлиберина увеличивается приблизительно в 10 раз. По-видимому, это связано с уменьшением числа рецепторных мест люлиберина в клетках, секретирующих ЛГ. Следует отметить, что после обработки 17β-эстрадиолом эффект тестостерона устраняется. Модуляция числа рецепторных мест люлиберина, индуцируемая стероидами, позволяет объяснить те изменения чувствительности гипофиза к люлиберину, которые наблюдаются во время эстрального цикла [72].

## VI. АНАЛОГИ ЛЮЛИБЕРИНА

Возможность совершенствования контрацептивных препаратов на основе ингибирующих аналогов люлиберина обусловливает интерес к синтезу и тщательному исследованию активности соединений, обладающих мощным ингибирующим действием. В качестве

антагонистов люлиберина пригодны те аналоги, которые будут: а) иметь достаточно высокое сродство к рецептору люлиберина, но способны взаимодействовать с этим рецептором, не приводя к освобождению ЛГ и ФСГ; б) устойчивы к деградации в условиях in vivo. Связывающую способность лучше всего оценивать в системе in vitro, тогда как вторичные действия аналогов — в экспе-

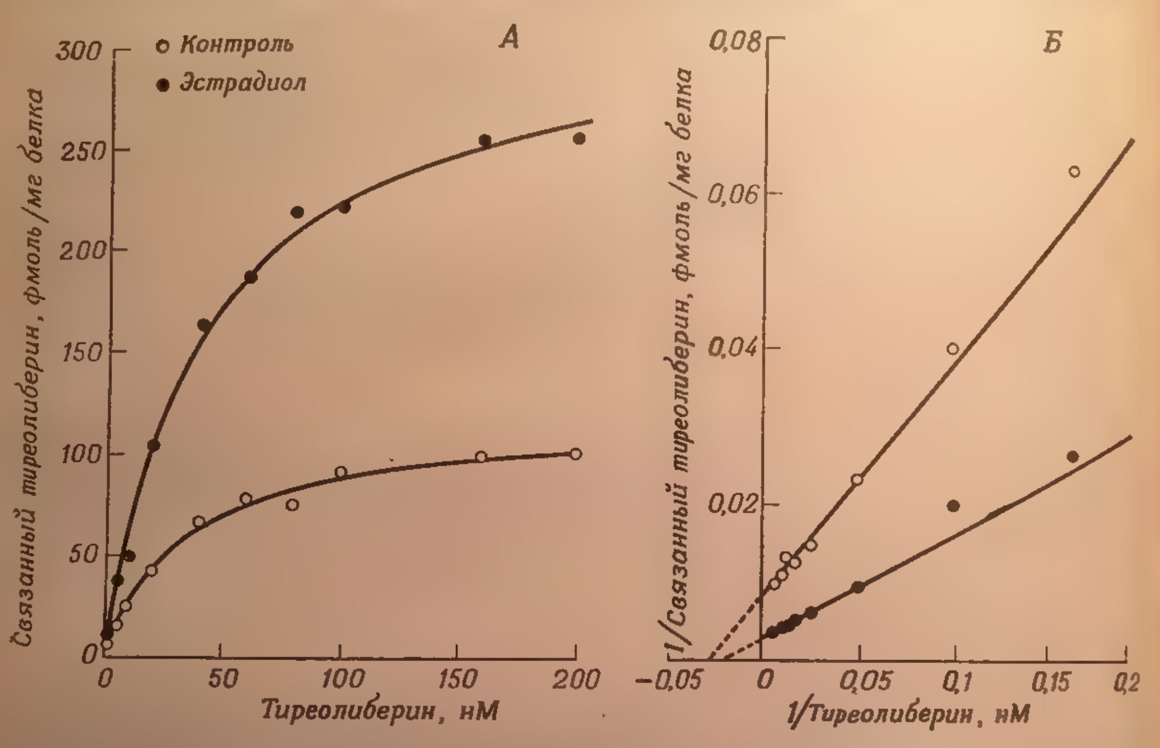



**Рис. 6.** Влияние обработки эстрадиолбензоатом (10 дней по 25 мкг/день) на характеристики связывания $^3$H-тиролиберина гомогенатом гипофиза крыс. В опытах использовали взрослых самцов, связывание определяли, как описано [43].

риментах in vivo. Исследования взаимоотношения структуры и активности аналогов, которые проводятся раздельно на двух уровнях (определение сродства рецептора и периферической деградации), должны дать информацию, необходимую для синтеза высокоактивных соединений.

В нашей первой работе [22] мы проверили способность 16 синтетических аналогов люлиберина ингибировать в монослойной культуре аденогипофизарных клеток стимуляцию освобождения ЛГ, индуцируемую люлиберином в концентрации $3 \cdot 10^{-9}$ М. Полумаксимальное торможение освобождения ЛГ, индуцируемого люлиберином, было получено при использовании (деГис², D-Ала⁶) люлиберина в концентрации $\sim 3 \cdot 10^{-6}$ М, этиламида (деГис², D-Ала⁶, деГли-NH$_2^{10}$) люлиберина в концентрации $6 \cdot 10^{-6}$ М, (деГис², D-Лей⁶) люлиберина в концентрации $4 \cdot 10^{-6}$ М (рис. 8), (D-Фен²) люлиберина в концентрации $6 \cdot 10^{-6}$ М (рис. 8), трифторэтиламида (деГис², деГли-NH$_2^{10}$) люлиберина в концентрации

$3 \cdot 10^{-5}$ М, пропиламида (деГис²)люлиберина в концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ М и этиламида (Лей², Лей³, D-Ала⁶, деГли-$NH_2^{10}$)люлиберина в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М. Никакой антагонистической активности не было обнаружено при тестировании следующих аналогов, взятых в 300-кратном молярном избытке по отношению к люлиберину: этиламида (деГис², Лей³, D-Ала⁶, деГли-$NH_2^{10}$)люлиберина,

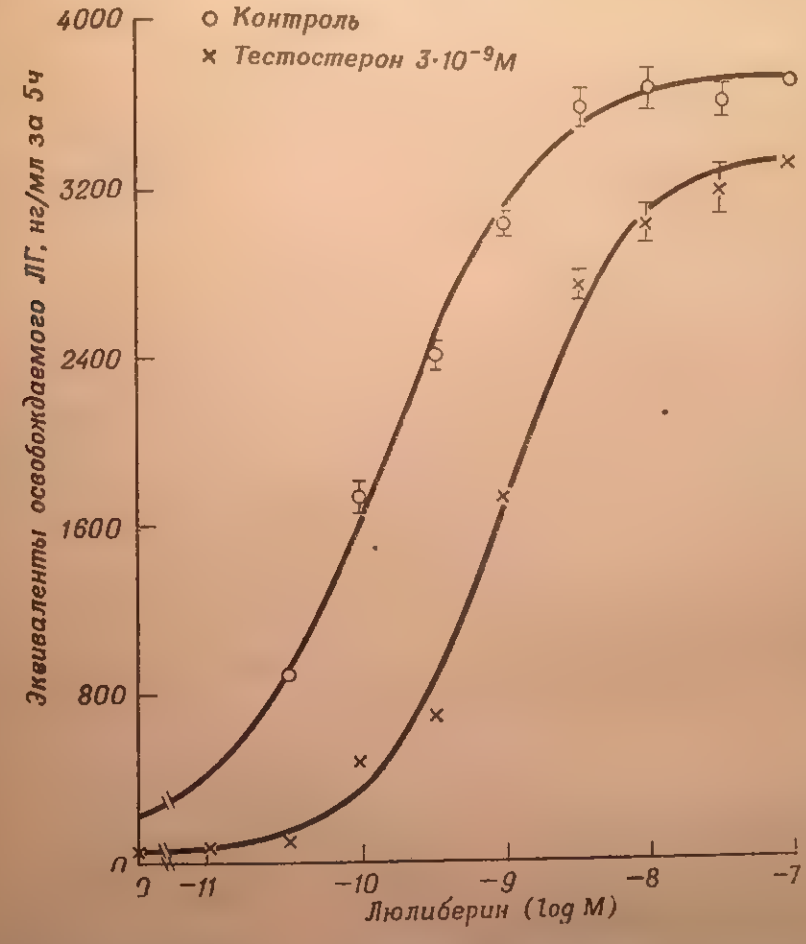



**Рис. 7.** Влияние тестостерона на кажущуюся $K_м$ стимуляции освобождения ЛГ под действием люлиберина в монослойной культуре клеток гипофиза. Клетки преинкубировали в течение 36 ч в присутствии или в отсутствие $3 \cdot 10^{-9}$М тестостерона, а затем инкубировали 4 ч с люлиберином в возрастающих концентрациях.

этиламида (Про¹, D-Ала⁶, деГли-$NH_2^{10}$)люлиберина и этиламида (D-(пиро) Глу, деГис², деГли-$NH_2^{10}$)люлиберина.

Как видно на рис. 9, самым мощным из испытанных в данном эксперименте аналогов был (D-Фен², D-Лей⁶) люлиберин, на 50% подавлявший действие люлиберина при молярных соотношениях от 30 до 100.

На рис. 10 показано, что подкожная инъекция 30 мкг (деГис², D-Ала⁶)люлиберина, (деГис², D-Лей⁶)люлиберина или (D-Фен², D-Лей⁶)люлиберина в двух равных дозах, вводимых за 20 мин

и в момент инъекции 100 нг люлиберина, вызывает 90%-ное подавление ответа к гипоталамическому гормону, измеряемому по уровню ЛГ в плазме [73].

Первыми аналогами, которые, как сообщалось, ингибировали действие люлиберина на освобождение ЛГ in vitro, были (деГис²)-люлиберин и (Гли²)люлиберин [74, 75]. Гораздо эффективнее

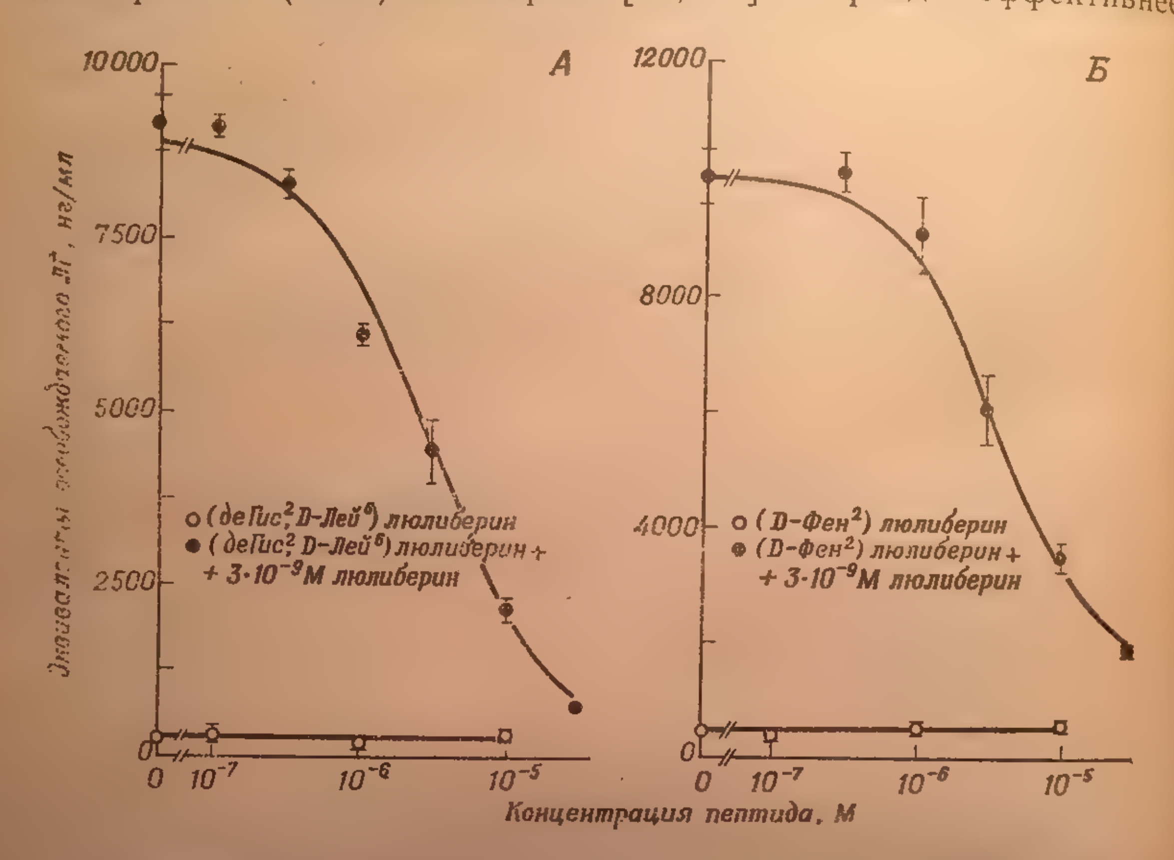



**Рис. 8.** Влияние (деГис², D-Лей⁶)люлиберина (*А*) и (D-Фен²)люлиберина (*Б*) в возрастающих концентрациях на освобождение ЛГ в монослойной культуре клеток аденогипофиза в отсутствие (светлые кружки) или в присутствии (темные кружки) $3 \cdot 10^{-9}$М люлиберина.

оказались ингибиторы, недавно синтезированные на основе изменений структуры люлиберина, затрагивающих другие аминокислотные остатки, помимо гистидина в положении 2. Такие изменения, включающие модификацию C-концевой аминокислоты и замену глицина в положении 6 на D-аминокислоту [21, 22, 73, 76], позволили получить пептиды, более активные, чем природный гормон.

Мы уже отмечали ранее, что замещение в люлиберине C-концевого глицина этиламидом не улучшает ингибирующей активности этого пептида при испытании его в условиях как in vivo [73], так и in vitro [22]. Например, этиламид (деГис², D-Ала⁶, деГли-$NH_2^{10}$)люлиберина вызывает менее значительное угнетение накопления цАМФ и освобождения ЛГ и ФСГ, чем (деГис², D-Ала⁶)-

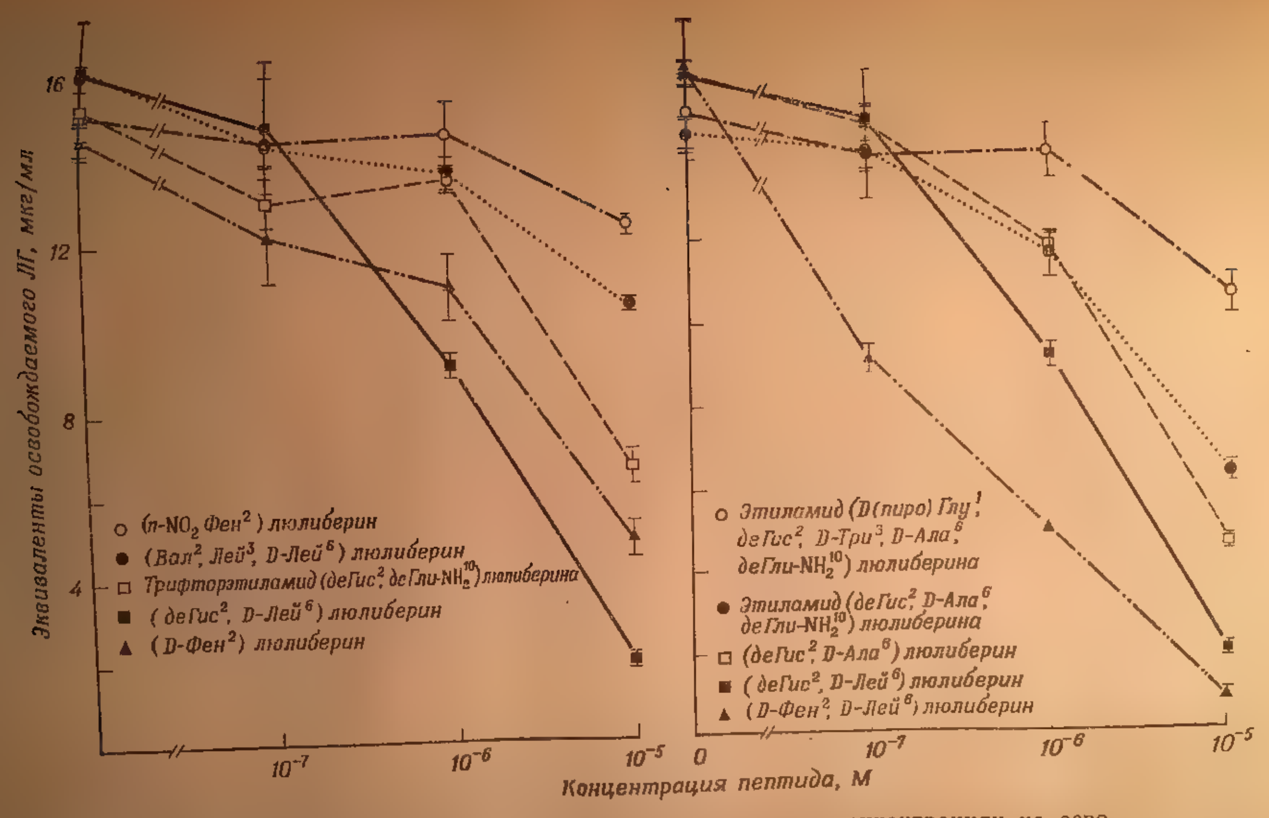



**Рис. 9.** Влияние аналогов люлиберина в возрастающих концентрациях на освобождение ЛГ, индуцируемое люлиберином в концентрации $3 \cdot 10^{-9}$М в монослойной культуре клеток гипофиза.

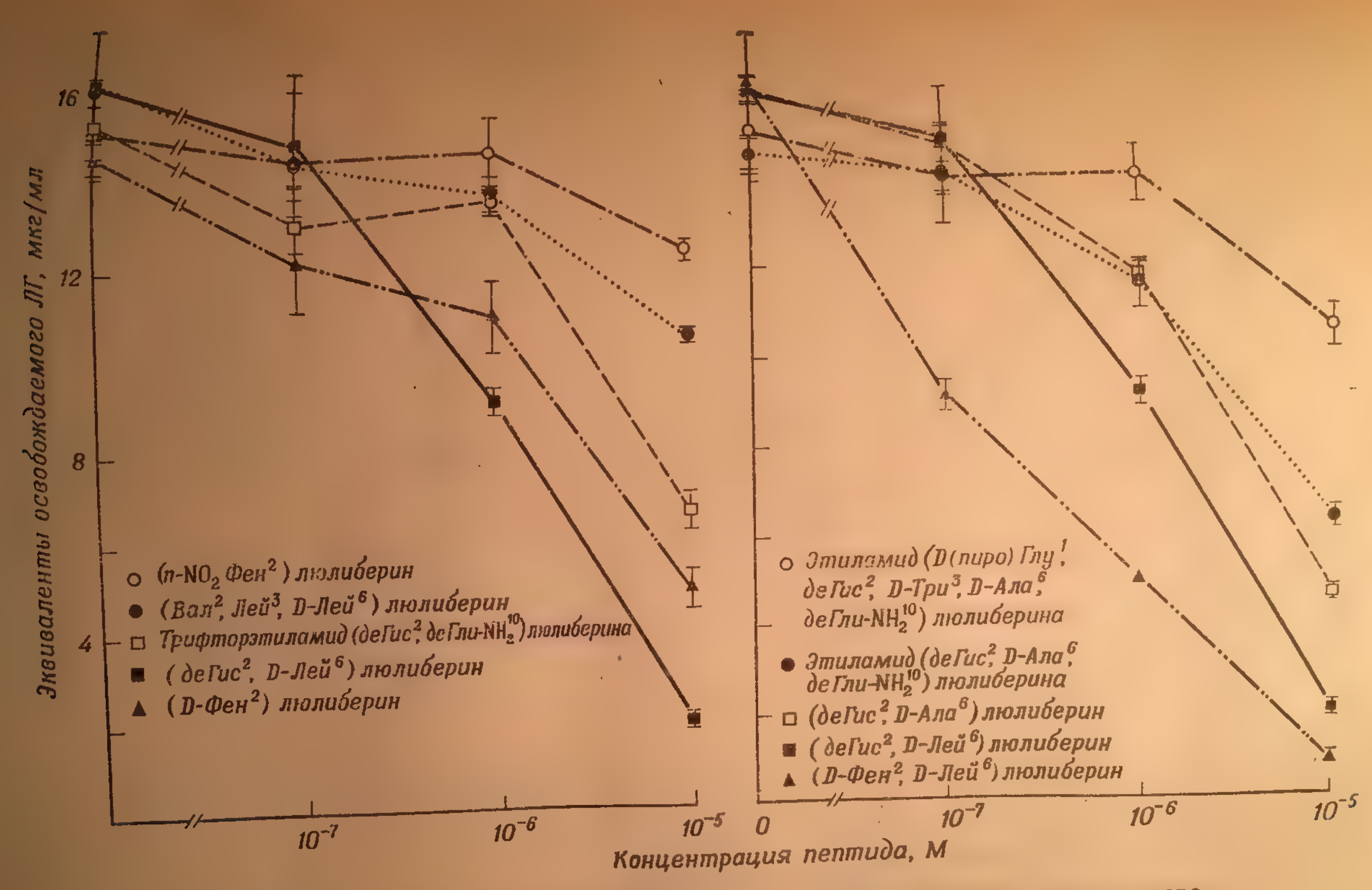



**Рис. 9.** Влияние аналогов люлиберина в возрастающих концентрациях на освобождение ЛГ, индуцируемое люлиберином в концентрации $3 \cdot 10^{-9}$М в монослойной культуре клеток гипофиза.

люлиберин [23]. По крайней мере частично это может быть обусловлено присущей аналогу низкой стимуляторной активностью, которая проявляется при использовании аналога в высоких концентрациях [22]. С помощью модификаций люлиберина, включа-

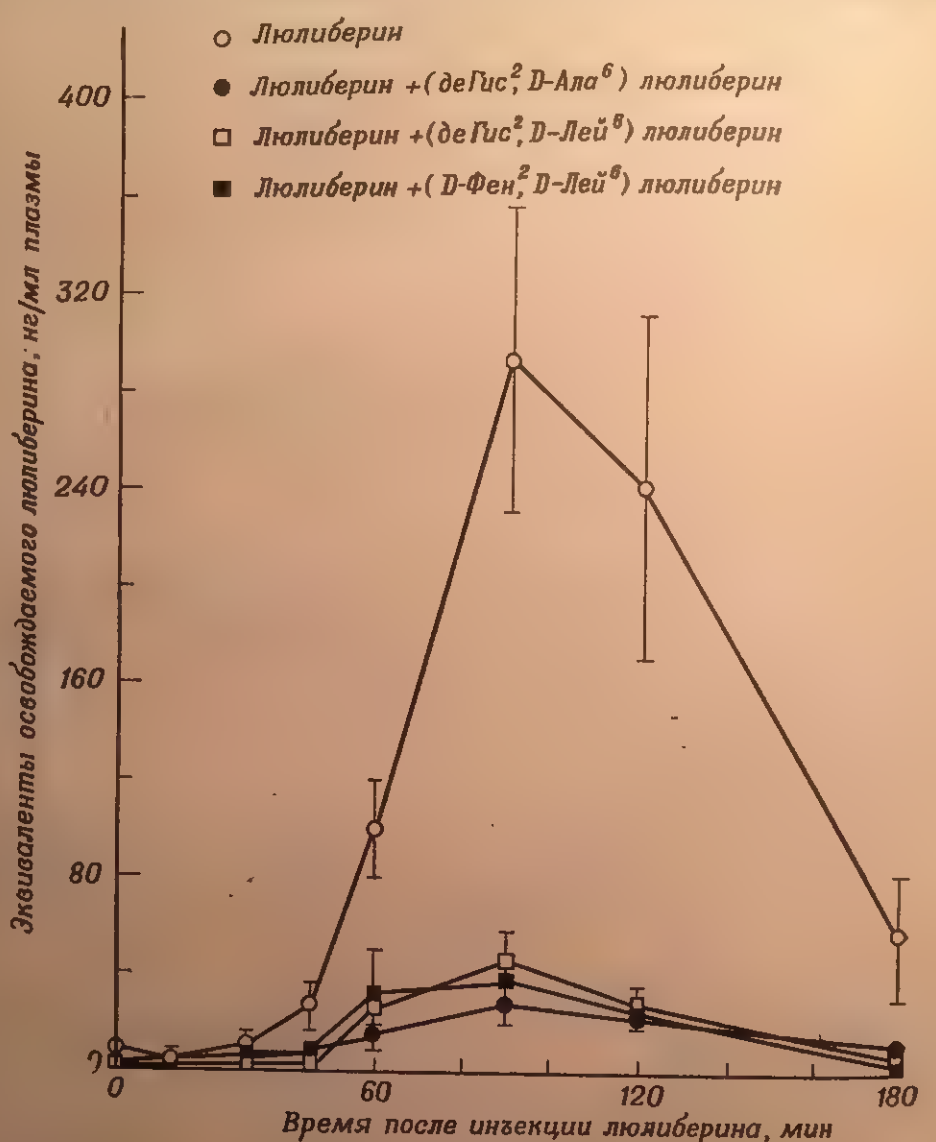



Рис. 10. Влияние (деГис$^2$, D-Ала$^6$)люлиберина, (деГис$^2$, D-Лей$^6$) люлиберина и (D-Фен$^2$, D-Лей$^6$)люлиберина на ответ к 100 нг люлиберина, определяемый по изменению концентрации ЛГ в плазме наркотизированных самок крыс, взятой днем на стадии проэструса. Указанные аналоги были инъецированы подкожно в двух равных дозах (общее количество 30 мкг) за 20 мин до и в момент инъекции люлиберина.

ющих удаление гистидина в положении 2 и замещение глицина в положении 6 D-аминокислотами [21, 22, 73, 76], получены довольно мощные ингибиторы природного гормона. Примерами таких эффективных аналогов служат (деГис$^2$, D-Ала$^6$)люлиберин и (деГис$^2$, D-Лей$^6$)люлиберин.

Еще более эффективной оказалась замена остатка гистидина в положении 2 D-фенилаланином [22, 73, 77]. Действительно, как

показали наши данные, (D-Фен[2], D-Лей[6]) люлиберин и (D-Фен[2], D-Фен[6]) люлиберин могут подавлять на 50% эффект люлиберина in vitro при молярных соотношениях, приблизительно равных соответственно 100 и 30. Результаты этих исследований, проведенных с изолированными половинками гипофизов, хорошо согласуются с данными, полученными при изучении освобождения ЛГ, индуцированного люлиберином, в монослойной культуре гипофизарных клеток [22].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pelletier G., Labrie F., Puviani R., Arimura A., Schally A. V.,* Endocrinology, *95*, 314 (1974).
2. *McCann S. M., Porter J. C.,* Physiol. Rev., *39*, 240 (1969).
3. *Schally A. V., Arimura A., Kastin A. J.,* Science, *179*, 341 (1973).
4. *Bøler J., Enzman F., Folkers K., Bowers C. Y., Schally A. V.,* Biochem. Biophys. Res. Commun., *37*, 705 (1969).
5. *Burgus R., Dunn T. F., Desiderio D., Guillemin R.,* C. R. Acad. Sci. [D] (Paris), *269*, 1870 (1969).
6. *Matsuo H., Baba Y., Nair R. M. G., Arimura A., Schally A. V.,* Biochem. Biophys. Res. Commun., *43*, 1334 (1971).
7. *Burgus R., Butcher M., Ling N., Monahan M., Rivier J., Fellows R., Amoss M., Blackwell R., Vale W., Guillemin R.,* C. R. Acad. Sci. [D] (Paris), *273*, 1611 (1971).
8. *Brazeau P., Vale M.,* Burgus R., Ling V., Butcher M., Rivier J., Guillemin R., Science, *179*, 77 (1973).
9. *Schally A. V., Dupont A. Arimura A., Redding T. W., Linthicom G. L.,* Fed. Proc. *34*, 584 (1975).
10. *Borgeat P., Chavancy G., Dupont A., Labrie F., Arimura A., Schally A. V.,* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 2677 (1972).
11. *Borgeat P., Labrie F., Côte J., Ruel F., Schally A. V., Coy D. H., Coy E. J., Yanaihara N.,* J. Mol. Cell. Endocrinol., *1*, 7 (1974).
12. *Jutisz M., Kerdelhue B., Berault A., De la Llosa P.,* in: Gondotropins (B. B. Saxena, C. C. Beling and H. M. Gandy, eds.), Wiley-Interscience, New York, pp. 64—71.
13. *Kaneko T., Saito S., Oka H., Ika T., Yanaihara N.,* Metabolism, *22*, 77 (1973).
14. *Labrie F., Polletier G., Lemay A., Borgeat P., Barden N., Dupont A., Savary M., Coté J., Boucher R.,* in: 6th Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology (Egon Diczfalusy, ed.), Bogtrykkeriet Forum, Copenhagen, 1973, pp. 301—340.
15. *Labrie F., Pelletier G., Barden N.,* Advances in Sex Hormone Research (J. A. Thomas and R. L. Singhal, eds.), University Park Press, Baltimore, Md., 1975, pp. 77—127.
16. *Makino T.,* Am. J. Obst. Gynecol., *115*, 606 (1973).
17. *Labrie F., Borgeat P., Lemay A., Lemaire S.. Barden N., Drouin J., Lemaire I., Bélanger A.,* Adv. Cyclic Nucleotide Res., *5* (1975).
18. *Borgeat P., Labrie F., Drouin J., Bélanger A., Immer I., Sestanj K., Nelson V., Götz M., Schally A. V., Coy D. H., Coy E. J.,* Biochem. Biophys. Res. Commun., *56*, 1052 (1974).
19. *Kaneko T., Oka H., Saito S., Munemura M., Musa K., Oda T., Yanaihara N., Yanaihara C.,* Endocrinol. Jpn., *20*, 535 (1973).
20. *Ferland L., Labrie F., Coy D. H., Coy E. J., Schally A. V.,* Fertil. Steril., *26*, 889 (1975).
21. *Vilchez-Martinez J. A., Schally A. V., Coy D. H., Coy E. J., Debeljuk L., Arimura A.,* Endocrinology, *95*, 213 (1974).

22. *Labrie F., Savary M., Coy D. H., Coy E. J., Schally A. V.*, Endocrinology, *98*, 289 (1976).
23. *Beaulieu M., Labrie F., Coy D. H., Coy E. J., Schally A. V.*, Adv. Cyclic Nucleotide Res., 1, 243 (1975).
24. *Bowers C. Y.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., *185*, 263 (1971).
25. *Robinson G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W.*, Annu. Rev. Biochem., *37*, 149 (1968).
26. *Lefkowitz R. J., Roth J., Pastan I.*, Nature, *228*, 864 (1970).
27. *Lefkowitz R. J., Roth J., Pricer W., Pastan I.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *65*, 745 (1970).
28. *Lin S. Y., Goodfriend T. L.*, Am. J. Physiol., *218*, 1319 (1970).
29. *Tomasi V., Koretz S., Ray T. K., Dunnick J., Marinetti G. V.*, Biochem. Biophys. Acta, *211*, 31 (1970).
30. *Rodbell M., Krans H. M. J., Pohl S. L., Birnbaumer L.*, J. Biol. Chem., *246*, 1861 (1971).
31. *Rodbell M., Krans H. M. J., Pohl S. L., Birnbaumer L.*, J. Biol. Chem., *246*, 1872 (1971).
32. *Neville D. M., Jr.*, J. Biophys. Biochem. Cytol., *8*, 413 (1960).
33. *Poirier G., De Lean A., Pelletier G., Lemay A., Labrie F.*, J. Biol. Chem., *249*, 316 (1974).
34. *Song C. S., Bodansky O.*, J. Biol. Chem., *242*, 694 (1967).
35. *Emmelot P., Bos C. J.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *120*, 369 (1966).
36. *Bosmann H. B., Case K. R.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *36*, 380 (1969).
37. *Benedetti E. L., Emmelot P.*, in: Ultrastructure in Biological Systems, Vol. 4 (A. J. Dalton and M. Haguenau, eds.), Academic Press, New York, 197, p. 33, 1968.
38. *Stirling C.*, J. Cell Biol., *53*, 704 (1972).
39. *Blostein R., Whittington E. S.*, J. Biol. Chem. *248*, 1772 (1973).
40. *Pohl S. L., Birnbaumer L., Rodbell M.*, Science, *164*, 566 (1969).
41. *Yamashita K., Field J. B.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. *40*, 171 (1970).
42. *Rosen O. M., Rosen S. M.*, Arch. Biochem. Biophys., *131*, 449 (1969).
43. *Labrie F., Barden N., Poirier G., De Léan A.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 283 (1972).
44. *Grant G., Vale W., Guillemin R.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *46*, 28 (1972).
45. *Hinkle P. M., Tashjian A. J., Jr.*, J. Biol. Chem., *248*, 6180 (1973).
46. *Grant G., Vale W., Guillemin R.*, Endocrinology, *92*, 1629 (1973).
47. *Hinkle P. M., Woroch E. L., Tashjian A. H., Jr.*, J. Biol. Chem., *249*, 3085 (1974).
48. *Gourdji D., Tixier-Vidal A., Morin A., Pradelles F., Morgat J. L., Fromageot P., Kerdelhue B.*, Exp. Cell Res., *82*, 39 (1973).
49. *Vale W., Grant G., Amoss M., Blackwell R., Guillemin R.*, Endocrinology, *91*, 562 (1972).
50. *Tashjian A. H., Jr., Borowsky N. J., Jensen D. K.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *43*, 516 (1971).
51. *Barden N., Labrie F.*, Biol. Chem., 248, 7601 (1973).
52. *Poirier G., Labrie F., Barden N., Lemaire S.*, FEBS Lett., *20*, 283 (1972).
53. *Wilber J. F., Seibel M. J.*, Endocrinology, *92*, 888 (1973).
54. *Pohl S. L., Krans H. M. J., Kozyreff V., Birnbaumer L., Rodbell M.*, J. Biol. Chem., *246*, 447 (1971).
55. *Rodbell M., Krans H. M. J., Pohl S. L., Birnbaumer L.*, J. Biol. Chem., *246*, 1861 (1971).
56. *De Lean A., Beaulieu D., Labrie F.*, Clin. Res., *22*, 730A (1974).
57. *Rivier C., Vale W.*, Endocrinology, *95*, 978 (1974).
58. *Vale W., Brazeau P., Grant G., Nussey A., Burgus R., Rivier R., Ling N., Guillemin R.*, C. R. Acad. Sci. [D] (Paris), *275*, 2913 (1972).
59. *Bélanger A., Labrie F., Borgeat P., Savary M., Côte J., Drouin J.*, Mol. Cell. Endocrinol., *1*, 329 (1974).
60. *Vale W., Rivier P., Brazeau P., Guillemin R.*, Endocrinology, *95*, 968 (1974).

61. *Drouin J., De Léan A., Rainville D., Lachance R., Labrie F.*, Endocrinology, *98*, 514 (1976).
62. *Hall R., Besser G. M., Schally A. V., Coy D. H., Evered D., Goldie D. J., Kastin A. J., McNeilly A. S., Mortimer C. H., Phenekos C., Tunbridge W. M. G., Weightman D.*, Lancet. 2, 581 (1973).
63. *Hall R., Besser G. M., Schally A. V., Coy D. H., Evered D., Goldie D. J., Kastin A. J., McNeilly A. S., Mortimer C. H., Phenekos C., Tunbridge W. M. G., Weightman D.*, Lancet, *2*, 581 (1973).
64. *Siler T. M., Yen S. S. C., Vale W., Guillemin R.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *38*, 742 (1974).
65. *Yen S. S. C., Siler T. M., De Vane G. W.*, N. Engl. J. Med., *290*, 935 (1974).
66. *Alberti K. G. M. M., Christensen S. E., Iversen J., Seyer-Hansen K., Chrstensen N. J., Prange-Hansen A., Lindbaek K., Orskov H.*, Lancet, *2*, 1299 (1973).
67. *Mortimer C. H., Carr D., Ling T., Bloom S. R., Mallinson C. N., Schally A. V., Tunbridge W. M. G., Yeomans L., Coy D. H., Kastin A. J., Besser G. M., Hall R.*, Lancet, *1*, 697 (1974).
68. *DeVane G. W., Siler T. M., Yen S. S. C.*, J. Clin Endocrinol. Metab., *38*, 913 (1974).
69. *Gerich J. E., Lorenzi M., Schneider V., Karam J. H., Rivier J., Guillemin R., Forsham P. H.*, N. Engl. J. Med., *291*, 544 (1974).
70. *Bloom S. R., Mortimer C. H., Thorner M. D., Besser G. M., Hall R., Gomez-Pan A., Roy V. M., Russell R. C. G., Coy D. H., Kastin A. J., Schally A. V.*, Lancet, *2*, 1106 (1974).
71. *Drouin J., Veilleux R., Labrie F.*, в печати.
72. *Ferland L., Labrie F., Coy D. H., Coy E. J., Schally A. V.*, Fertil. Steril., *26*, 889 (1975).
73. *Vale W., Grant G., Rivier J., Monahan M., Amoss M., Blackwell R., Burgus R., Guillemin R.*, Science, *176*, 933 (1972).
74. *Monahan M., Rivier J., Vale W., Guillemin R., Burgus R.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *47*, 551 (1974).
75. *Monahan M. W., Amoss M. S., Anderson H. A., Vale W.*, Biochemistry, *12*, 4616 (1973).
76. *Rees R. W. A., Foell T. J., Chai S. Y., Grant N.*, J. Med. Chem., *17*, 1016 (1974).

## Глава 6

# РЕЦЕПТОРЫ ОКСИТОЦИНА

*М. СОЛОФФ*

Department of Biochemistry
Medical College of Ohio at Toledo
Toledo, Ohio

### 1. ВВЕДЕНИЕ

Окситоцин синтезируется в ядрах гипоталамуса, а хранится в задней доле гипофиза. Определение структуры этого пептидного гормона, состоящего из 9 аминокислотных остатков, и его последующий синтез были проведены в лаборатории Дю Виньо [1]. В настоящее время окситоцин получают синтетическим путем с использованием твердофазных методов [2]. Синтезированы и исследованы также многие аналоги этого гормона, обладающие различной биологической активностью [3, 4].

Основное биологическое действие окситоцина у млекопитающих как in vivo, так и in vitro состоит в стимуляции сокращения мышц матки [5—7] и миоэпителиальных клеток, окружающих альвеолы молочной железы [8—12]. Благодаря сокращениям клеток миоэпителия, которые по своей структуре сходны с клетками гладких мышц (содеражат пучки нитей), молоко из альвеол поступает в протоки молочной железы [14—16].

Еще до того, как стал доступен меченый окситоцин, Гинсбург и Смит [17] обнаружили, что скорость выведения экзогенного окситоцина у лактирующих самок крыс значительно больше, чем у нелактирующих самок, а также самцов крыс. Другие исследователи, изучавшие распределение $^{3}$H-окситоцина в тканях небеременных крыс, показали, что матка проявляет относительно высокое сродство к окситоцину [18].

Получение $^{3}$H-окситоцина с удельной активностью от 20 до 43 Ки/мМ [19, 20] позволило продемонстрировать наличие специфических окситоцинсвязывающих мест в молочной железе, матке и других органах-мишенях этого гормона. В табл. 1 приведены окситоцинсвязывающие системы различных тканей-мишеней и органов-мишеней.

$^{3}$H-окситоцин накапливается in vitro в кусочках ткани молочной железы [21, 22] и матки [22, 24] при инкубации в условиях,

*Таблица 1*

**Окситоцинсвязывающие места**

| | Источник данных |
|---|---|
| *Ткани и органы* | |
| Молочная железа крысы | [21—23] |
| Матка крысы | [22, 24] |
| Эпителий кожи лягушки | [25, 26] |
| *Изолированные клетки* | |
| Молочная железа крысы | [27] |
| Жировая ткань | [28] |
| *Препараты разрушенных клеток* | |
| Молочная железа крысы | [29] |
| Матка крысы | [30] |
| Миометрий свиньи | [20] |
| Миометрий женщины | [31] |
| Миометрий овцы | [32] |
| Эндометрий овцы | [32] |
| Яйцевод крысы | [23, 33] |
| Мочевой пузырь лягушки | [34] |

обеспечивающих стимуляцию указанным гормоном соответственно лактации и сокращения матки. Конкуренция аналогов окситоцина с меченым гормоном за связывающие места обычно пропорциональна биологической активности [21, 24]. С помощью радиоавтографии было установлено, что радиоактивность в яйцеводе и молочной железе крысы специфически локализуется соответственно в гладких мышцах и клетках миоэпителия [23].

Связывание $^3$H-окситоцина наблюдается также при добавлении его непосредственно к отдельным фракциям гомогенатов молочной железы [29] и матки [30, 31]. Сродство некоторых аналогов этого гормона к соответствующим рецепторам коррелирует с их биологической активностью [29—31]. Значения кажущейся $K_d$ для связывания окситоцина фракциями частиц тканей молочной железы [29] и матки [30] крысы, миометрия свиньи [30] и человека [31] соответствуют концентрациям этого гормона, при которых наблюдается полумаксимальный биологический ответ. Факторы, изменяющие связывание окситоцина фракциями частиц, вызывают и соответствующие изменения биологического ответа. К таким факторам относятся двухвалентные катионы, например $Mg^{2+}$ и $Mn^{2+}$, увеличивающие связывание, и некоторые реагенты на сульфгидрильные группы, уменьшающие связывание [29, 30]. При введении эстрогенов, повышающих чувствительность сократительной способности матки к окситоцину, наблюдается увеличение числа связывающих мест и сродства окситоцина к ткани матки крысы [35]. Из приведенных данных следует, что связывающие места являются составной частью окситоцин-рецепторных систем матки и молочной железы.

Работы по изучению рацепторов окситоцина в коже и эпителии мочевого пузыря, а также в жировых клетках лягушки будут рассмотрены позднее.

## II. РАДИОАВТОГРАФИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛОКАЛИЗАЦИИ ОКСИТОЦИНСВЯЗЫВАЮЩИХ МЕСТ

$^3$H-окситоцин, поглощаемый in vitro молочной железой и яйцеводом лактирующих крыс, был локализован с помощью радиоавтографии [23]. Радиоактивность накапливалась в клетках

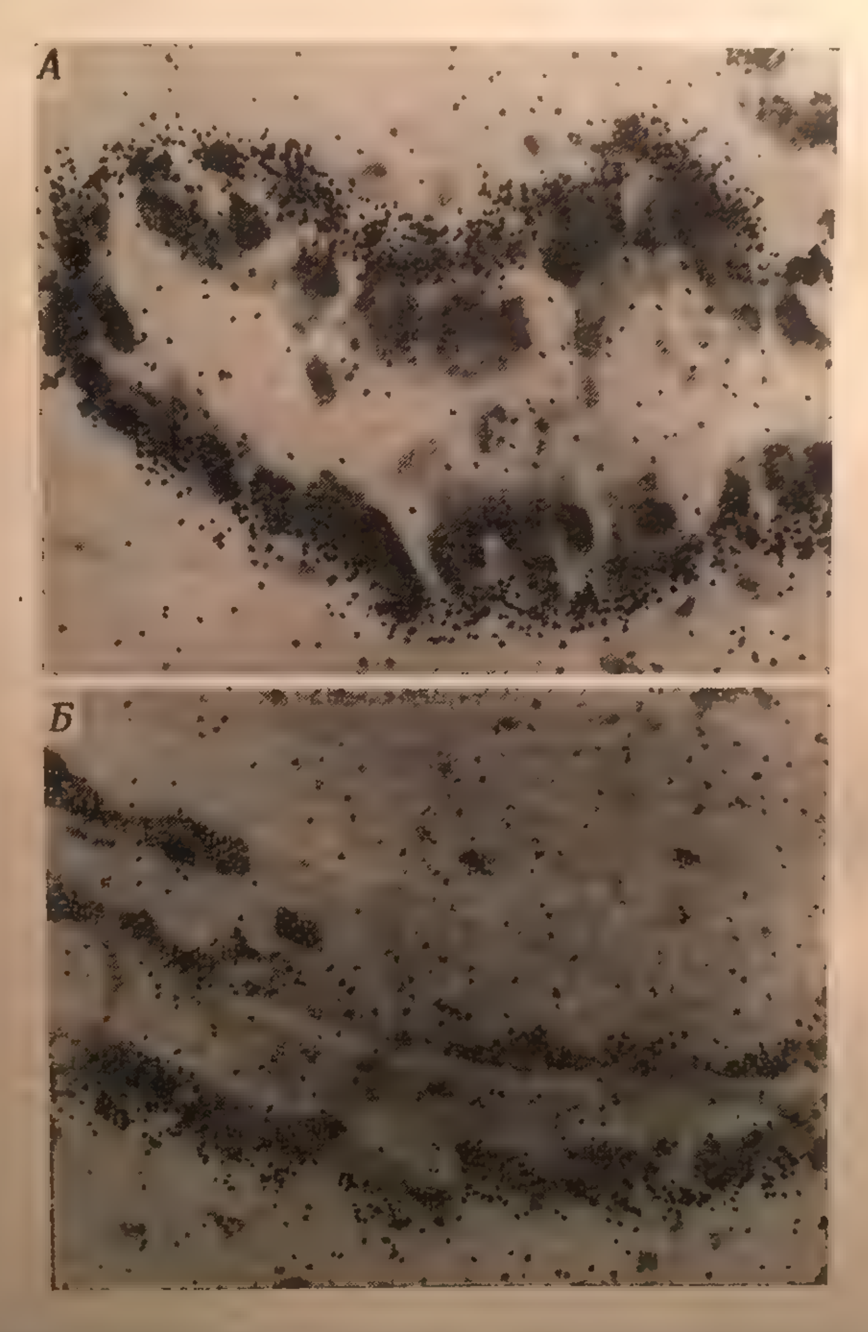



**Рис. 1.** Радиоавтографы ткани молочной железы, инкубированной в течение 40 мин в растворе Тироде, содержащем $^3$H-окситоцин. Радиоактивность накапливается в областях, соответствующих местоположению миоэпителиальных клеток в эпителии альвеол (*А*) и яйцевода (*Б*). Время экспозиции — 410 дней, 4 мкм; ×800 (*А*) и ×440 (*Б*). Окрашивание метиловым зеленым — пиронином [233].

миоэпителия, окружающих альвеолы и расположенных вдоль протоков молочной железы (рис. 1), а также в клетках гладких мышц яйцеводов (рис. 2). Однако при инкубации указанных тканей с $^{3}H$-окситоцином в присутствии 30-кратного избытка немеченого гормона радиоактивность уменьшалась либо вообще отсутствовала. Преимущественное накопление $^{3}H$-окситоцина в клетках-




**Рис. 2.** Радиоавтографы мышечной ткани яйцевода крыс, инкубированной в течение 40 мин в растворе Тироде, содержащем только $^{3}H$-окситоцин (*А*) и $^{3}H$-окситоцин в смеси с немеченым гормоном (*Б*). Радиоактивность концентрируется в мышечных клетках (*А*). Добавление избытка немеченого окситоцина приводит к снижению концентрации радиоактивности (*Б*). Время экспозиции — 410 дней, 4 мкм; ×530. Окрашивание метиловым зеленым — пиронином [23].

мишенях свидетельствует о том, что рецептор расположен в гормонсвязывающем участке этих клеток.

Несмотря на наличие в молочной железе гладких мышц, Ричардсон [14] и Линзел [15, 16] на основании данных морфологических исследований пришли к заключению, что окситоцин воздействует на миоэпителиальные клетки железы. Локализация $^3H$-окситоцина в областях, содержащих эти клетки, служит убедительным подтверждением результатов морфологических исследований.

## III. СВЯЗЫВАНИЕ ОКСИТОЦИНА ИЗОЛИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Окситоцин связывается клетками молочной железы лактирующих крыс, диспергированными 0,1%-ной коллагеназой [27]. Анализ графика Скэтчарда [36] позволяет выявить два типа связывающих мест — с высоким и низким сродством (рис. 3). Величина кажущейся $K_d$ связывания окситоцина с местами, имеющими высокое сродство к этому гормону, после коррекции на связывание гормона с местами, имеющими низкое сродство [37], составляет $1{,}8 \cdot 10^{-9}$ М. Эта величина приблизительно в два раза превышает $K_d$ для препаратов разрушенных клеток ткани молочной железы [29]. Наблюдаемое различие может быть обусловлено недостаточно высокой концентрацией $Mg^{2+}$ в инкубационной среде, в которой содержатся клетки. Изолированные клетки ткани молочной железы и фракция частиц этой же ткани, осаждающихся при 20 000 g, проявляют одинаковую лигандную специфичность в отношении (4-пролин) окситоцина, (4-треонин) окситоцина и (8-лизин) вазопрессина. Связывание клетками молочной железы является специфическим, поскольку было показано, что количество $^3H$-окситоцина, связанного эритроцитами, составляет лишь 3,5% меченого гормона, свя-

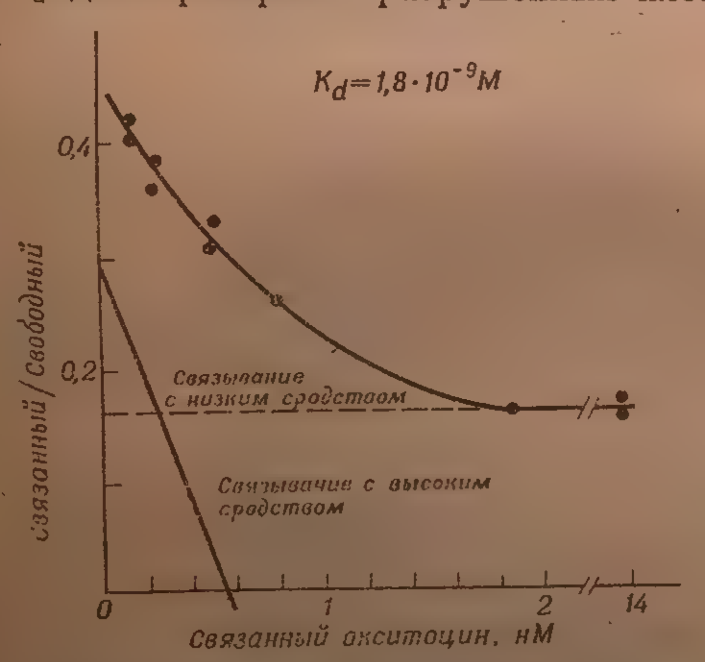



**Рис. 3.** Скэтчардовский график связывания $^3H$-окситоцина изолированными клетками молочной железы. Точками отмечены измеренные величины. Штриховая линия соответствует связыванию гормона с участками, имеющими низкое сродство и высокую емкость. Прямая линия — экспериментальная кривая с поправкой на концентрацию связывающих мест, имеющих низкое сродство [27].

зываемого с таким же числом клеток молочной железы. Количество $^3H$-окситоцина, связывающегося с эритроцитами, не меняется в присутствии 100-кратного избытка нерадиоактивного гормона, что указывает на связывание гормона с местами, имеющими относительно низкое сродство.

## IV. СРОДСТВО И СПЕЦИФИЧНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ

В табл. 2 представлены значения кажущихся $K_d$ окситоцина и концентрации связывающих мест в различных препаратах. Все значения $K_d$, за исключением значения для препарата мочевого пузыря лягушки, лежат в пределах наномолей. Величины $K_d$ для эпителия кожи и мочевого пузыря лягушки соответствуют концентрациям окситоцина, вызывающим полумаксимальную стимуляцию соответственно активного транспорта натрия [26] и активности аденилатциклазы [34]. Концентрация окситоцина, приводящая к полумаксимальному сокращению изолированной матки крысы, равна 1,2 нМ [38], что соответствует величине кажущейся

*Таблица 2*

**Сродство связывающих мест к окситоцину**

| Связывающие места | Кажущаяся $K_d$, нМ | Концентрация связывающих мест на 1 мг белка, фМ | Источник данных |
|---|---|---|---|
| *Фракции частиц* | | | |
| Молочная железа лактирующей крысы | 0,76 | 280 | [29] |
| Матка крысы | | | |
| Овариэктомированной | 10 | 330 | [35] |
| Овариэктомированной и обработанной в течение 24 ч эстрогенами | 2,4 | 390 | [35] |
| Интактной, обработанной в течение 2 дней эстрогенами | 1,8 | 180 | [30] |
| Яйцеводы крысы, обработанной в течение 2 дней эстрогенами | 1,8 | 233 | [33] |
| Миометрий свиньи (последняя треть беременности) | 1,5 | 150 | [30] |
| Миометрий женщины (конец первой трети беременности) | 2,8 | 180 | [31] |
| Миометрий овцы, эструс | 0,6 | 9[1] | [32] |
| Эндометрий овцы, эструс | 0,6 | 24[1] | [32] |
| Эпителий мочевого пузыря лягушки | 250 | — | [34] |
| *Клетки или ткань* | | | |
| Эпителий кожи лягушки | 2,5—5,5 | 1—2 | [26] |
| Изолированные клетки молочной железы | 1,8 | — | [27] |

[1]) С поправкой на связывание с местами, имеющими низкое сродство.

$K_d$ для связывания окситоцина фракцией частиц клеток матки (табл. 2). В ряде исследований [6, 8—12, 39] установлена самая низкая концентрация окситоцина, при которой возможен ответ молочной железы, но концентрация гормона, приводящая к полумаксимальному ответу, пока еще не определена. Величина $K_d$ для связывания окситоцина с фракцией частиц молочной железы приблизительно в два раза меньше величины $K_d$, характерной для

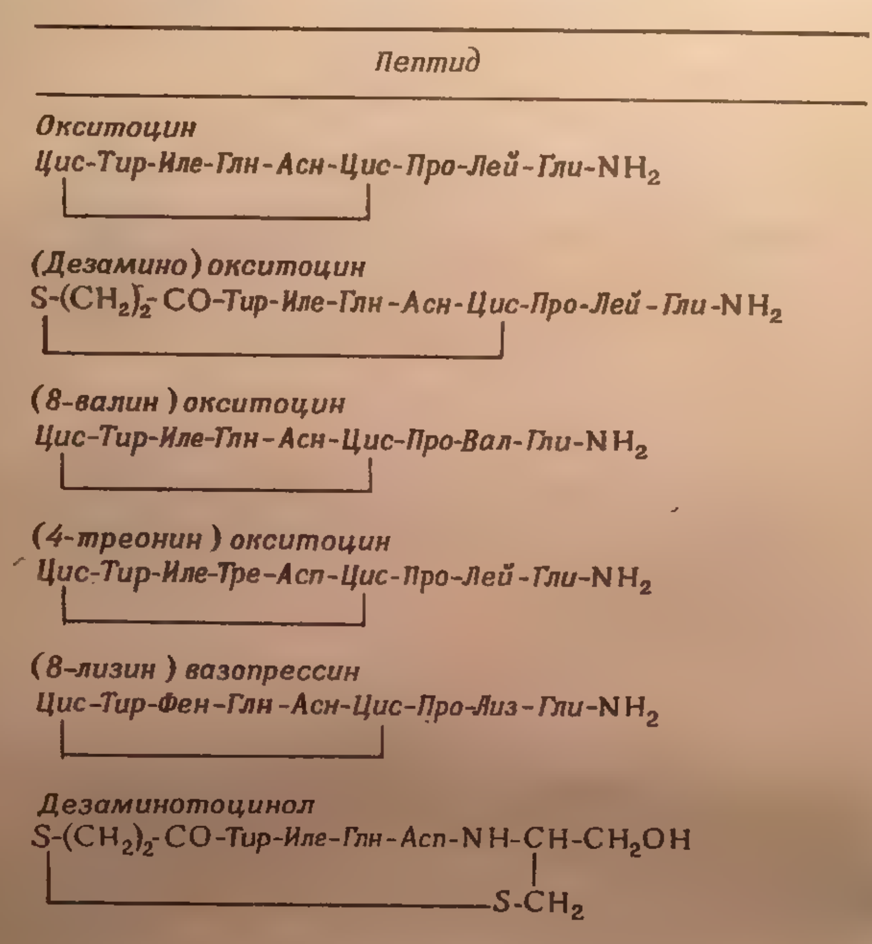



**Рис. 4.** Аналоги окситоцина, использованные при изучении рецептора этого гормона.

препарата матки; эти два значения соответствуют пределам физиологических концентраций окситоцина в крови.

Способность окситоцина образовывать комплекс с рецептором в клетках-мишенях и его биологическая активность, по-видимому, функционально взаимосвязаны, поскольку и то и другое свойства синтетических аналогов гормона определяются сходными структурными требованиями. Активность этих аналогов по отношению к активности окситоцина (рис. 4) лежит в пределах фактически от нуля до двух. Например, (4-пролин)окситоцин, который отличается от окситоцина наличием в положении 4 вместо глутамина пролина, практически не обладает биологической активностью [40] и не связывается с окситоцинсвязывающими местами ни в

одном из перечисленных в табл. 2 препаратов-мишеней. Другие аналоги, представленные на рис. 4, конкурируют с окситоцином за окситоцинсвязывающие места пропорционально логарифмам их концентраций [21, 24, 29—31]. Линии регрессии при конкурентном анализе в этом случае параллельны линии, полученной для нерадиоактивного окситоцина, что свидетельствует о наличии единого класса связывающих мест для данных аналогов.

Группа аналогов, использованных Бокаэртом и др. [25, 26] для изучения связывания окситоцина с эпителием кожи лягушки, включает вазотоцин [(8-аргинин) окситоцин; природный гормон, обнаруживаемый в нейрогипофизе амфибий[1]], (8-лизин) вазопрессин, (7-валин, 8-лизин) вазопрессин и (2-0-метилтирозин, 1-карбо)окситоцин — антагонист окситоцина.

## V. ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА ОКСИТОЦИНСВЯЗЫВАЮЩИХ МЕСТ В МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ И МИОМЕТРИИ

О химической природе рецептора окситоцина почти ничего не известно. Предполагается, что окситоцин воздействует на плазматические мембраны, поскольку этот гормон изменяет электрофизиологический статус миометрия [41—45] и протоков молочной

*Таблица 3*

**Фракционирование в градиенте плотности сахарозы клеточных частиц матки крыс, осаждающихся при 105 000 g [1]**

| Фракция сахарозного градиента | Связанный $^3$H-окситоцин, имп/мин | Белок, мкг | $\frac{\text{имп/мин}}{\text{мкг}}$ | 5′-нуклеотидаза, $\frac{\text{нмоль } Ф_н}{\text{мин·мг}}$ |
|---|---|---|---|---|
| I 10—28% | 1955 | 641 | 3,05 | 115 |
| II 28—35% | 276 | 346 | 0,80 | 40,4 |
| III 35—42% | 88 | 311 | 0,28 | 18,8 |
| IV 42—50% | 0 | 1120 | 0 | 13,6 |

[1] Фракции частиц (по 0,5 мл каждая) инкубировали с $^3$H-окситоцином (40 000 имп/мин) в присутствии либо 25 нг немеченого окситоцина, либо (4-пролин)окситоцина в течение 1 ч при 20° С. Затем пробы наслаивали на градиент, состоящий из 3 мл 50%-ной (по весу) сахарозы и 3,5 мл следующих растворов сахарозы: 42, 35, 28 и 10%. Пробы центрифугировали в течение 1,5 ч при 14 000 об/мин и 4° С, используя ротор Spinco SW-27. Было отобрано 35 фракций по 0,5 мл каждая. Специфическое связывание окситоцина выражали в виде разницы между радиоактивностями проб, содержащих (4-пролин)окситоцин и нерадиоактивный окситоцин. Активность белка [48] и 5′-нуклеотидазы [49] определяли во фракциях, соответствующих каждому из четырех пиков связывания.

[1] Вазотоцин обнаружен также в нейрогипофизе птиц, рептилий, рыб и круглоротых. — *Прим. ред.*

железы [46]. Действительно, все изученные к настоящему времени рецепторы пептидных гормонов, по-видимому, являются частью плазматических мембран соответствующих клеток-мишеней (см. обзор [47]. Окситоцинсвязывающая активность, присущая седиментируемым при 105 000 g частицам клеток молочной железы, при центрифугировании этого препарата в градиенте плотности сахарозы увеличивается приблизительно в два раза [27]. Наибольшее связывание в пересчете на 1 мг белка обнаруживается во фракции, соответствующей плотности сахарозы от 10 до 28%. В этой фракции сосредоточена также активность 5′-нуклеотидазы, считающейся маркером плазматических мембран клеток молочной железы. Большего обогащения препарата в отношении окситоцинсвязывающей активности достигнуть нельзя, так как клетки-мишени окситоцина составляют лишь часть клеток молочной железы. Для дальнейшей очистки рецепторов окситоцина в молочной железе, по-видимому, необходимо получить изолированные миоэпителиальные клетки.

С помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы связывающую активность препарата микросом из матки крысы удается обогатить в 3,2 раза (табл. 3). При этом наибольшая окситоцинсвязывающая активность так же, как и для препарата частиц клеток молочной железы, осаждающихся при 105 000 g, обнаруживается во фракции, которая соответствует плотности сахарозы 10—28%. В этой же фракции накапливается и активность 5′-нуклеотидазы, в 3,4 раза превышающая активность микросомного препарата. Сравнимые результаты были получены для фракции частиц клеток матки, осаждаемых при 20 000 g, хотя в этом случае было достигнуто только двукратное обогащение окситоцинсвязывающей активности. Поскольку 5′-нуклеотидаза является, по-видимому, адекватным маркером плазматических мембран гладких мышц матки [50, 51], корреляция между окситоцинсвязывающей активностью и активностью этого фермента подтверждает предположение о том, что рецепторы окситоцина расположены на плазматических мембранах клеток-мишеней.

Связывающий компонент клеток-мишеней состоит (по крайней мере частично) из белка, поскольку обработка трипсином и некоторыми реагентами на сульфгидрильные группы приводит к снижению или устранению связывания [29, 30]. По-видимому, угнетение окситоцининдуцированных сокращений изолированной матки крыс под действием N-этилмалеимида обусловлено именно подавлением связывания окситоцина частицами миометрия в присутствии 1 мМ этого соединения [52]. В отношении фосфолипидной природы рецепторных участков пока еще нельзя прийти к какому-либо определенному заключению, поскольку подавление связывания окситоцина под действием неочищенного препарата фосфолипазы А, возможно, вызывается присутствующими в этом препарате примесями [29, 30]. Более чистые препараты фосфолипазы D,

а также нейраминидаза не оказывают никакого влияния на связывание окситоцина с частицами клеток ни молочной железы, ни миометрия [29, 30].

Связывание окситоцина с указанными фракциями молочной железы крыс [29] и миометрия свиньи [30] в присутствии 1 мМ ГТФ, УТФ и ЦТФ снижается приблизительно на 30%. АТФ в той же концентрации уменьшает связывание почти на 70%, но пока механизм ингибирующего действия АТФ не известен.

## VI. ДЕЙСТВИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ

Ионы $Mg^{2+}$, и еще в большей степени ионы $Mn^{2+}$, значительно усиливают действие на матку окситоцина и его аналогов [53—57]. Ионы $Mg^{2+}$, кроме того, увеличивают способность окситоцина стимулировать сокращение кусочков ткани молочной железы in vitro [57]. Бентли [56] и Сомлио и др. [57] предположили, что $Mg^{2+}$ индуцирует конформационные изменения в мембранах клеток-мишеней, вызывая повышение сродства к окситоцину. Эту гипотезу подтверждают и наши данные [29, 30], свидетельствующие о том, что в присутствии ионов связывание $^3H$-окситоцина с фракциями частиц, выделенными из миометрия матки свиньи и молочной железы крысы, усиливается, а сила воздействия ионов подчиняется следующему соотношению: $Mn^{2+}=Co^{2+}>Mg^{2+}>Zn^{2+}$. Концентрации $Mg^{2+}$, приводящие к максимальному и полумаксимальному увеличению связывания гормона в миометрии и молочной железе, составляют соответственно 5 и 0,4 мМ. $^3H$-окситоцин не связывается препаратами молочной железы и матки в инкубационной среде в отсутствие двухвалентных катионов и в присутствии 1 мМ ЭДТА. Добавление ЭДТА к фракциям частиц молочной железы или матки, преинкубированных с $^3H$-окситоцином, приводит к освобождению связавшегося гормона. Связывание восстанавливается после отмывания частиц от ЭДТА и повторной инкубации с $^3H$-окситоцином в буфере, содержащем либо $Mg^{2+}$, либо $Mn^{2+}$. Предварительная инкубация частиц молочной железы в отсутствие $Mg^{2+}$ не снижает последующего связывания $^3H$-окситоцина этими частицами при добавлении 10 мМ $Mg^{2+}$ [29].

Изолированная матка и кусочки ткани молочной железы не сокращаются в ответ на окситоцин, если в инкубационной среде отсутствует $Ca^{2+}$ [41—44, 46], но после добавления этого иона их сокращение восстанавливается. $Ca^{2+}$ не оказывает никакого влияния на связывание $^3H$-окситоцина с фракциями частиц матки и молочной железы и, следовательно, должен принимать участие в молекулярных событиях, происходящих после взаимодействия окситоцина с рецептором. Этот вопрос мы обсудим более подробно в разд. XI. Одновалентные катионы, например $Na^+$, $K^+$ и $Li^+$ в концентрациях 100 мМ, не оказывают влияния на связывание окситоцина фракцией частиц молочной железы [29].

## VII. ДЕЙСТВИЕ ЭСТРОГЕНОВ НА РЕЦЕПТОРЫ ОКСИТОЦИНА В МАТКЕ

Эстрогены вызывают увеличение самопроизвольных сокращений матки и утеротонической активности окситоцина (см. обзор

*Таблица 4*

**Влияние однократного введения ДЭС на кажущуюся константу $K_a$ и число окситоцинсвязывающих мест в матке овариэктомированных крыс [35] [1]**

| Время после обработки ДЭС, ч | $K_a$, $M^{-1}\cdot 10^{-8}$ | Повышение сродства | Число связывающих мест на 1 мг белка, $M\cdot 10^{13}$ | Увеличение числа связывающих мест на 1 мг | Число связывающих мест на матку, $M\cdot 10^{13}$ | Увеличение числа связывающих мест на матку | Максимальное увеличение содержания связанного окситоцина на матку (данные колонки 3, умноженные на данные колонки 7) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| 0 | 1 | 1 | 3,3 | 1 | 4,9 | 1 | 1 |
| 6 | 1,9 | 1,9 | 2,5 | 0,76 | 5,0 | 1 | 1,9 |
| 12 | 3,1 | 3,1 | 3,6 | 1,1 | 6,8 | 1,4 | 4,3 |
| 24 | 4,2 | 4,2 | 3,9 | 1,2 | 10,5 | 2,1 | 8,8 |

[1]) Кажущаяся константа $K_a$ и число связывающих мест находили по графикам Скэтчарда [36].

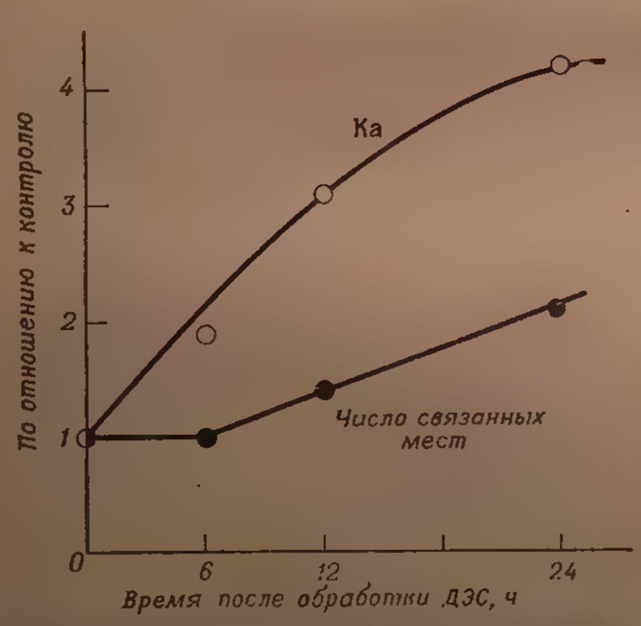



Рис. 5. Скорость увеличения кажущейся $K_a$ (светлые кружки) и числа окситоцинсвязывающих мест на матку (темные кружки) после обработки овариэктомированных крыс ДЭС. Контрольные группы животных не получали ДЭС [35].

[6]). Чувствительность матки к действию окситоцина становится максимальной при повышении концентрации эндогенных эстрогенов как на стадии проэструса [58, 59], так и эструса [60—62]. В метэструсе активность окситоцина, по-видимому, незначительна [59]. Повышенная чувствительность матки к окситоцину, вероятно, обусловлена повышением сродства к этому гормону, индуцированным эстрогенами, и увеличением числа окситоцин-рецепторных мест в матке [35]. Однократное введение 5 мкг диэтилстильбэстрола (ДЭС) овариэктомированным крысам вызывает повышение

## VII. ДЕЙСТВИЕ ЭСТРОГЕНОВ НА РЕЦЕПТОРЫ ОКСИТОЦИНА В МАТКЕ

Эстрогены вызывают увеличение самопроизвольных сокращений матки и утеротонической активности окситоцина (см. обзор

*Таблица 4*

**Влияние однократного введения ДЭС на кажущуюся константу $K_a$ и число окситоцинсвязывающих мест в матке овариэктомированных крыс [35]** [1])

| Время после обработки ДЭС, ч | $K_a$, $M^{-1} \cdot 10^{-8}$ | Повышение сродства | Число связывающих мест на 1 мг белка, $M \cdot 10^{13}$ | Увеличение числа связывающих мест на 1 мг | Число связывающих мест на матку, $м \cdot 10^{13}$ | Увеличение числа связывающих мест на матку | Максимальное увеличение содержания связанного окситоцина на матку (данные колонки 3, умноженные на данные колонки 7) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| 0 | 1 | 1 | 3,3 | 1 | 4,9 | 1 | 1 |
| 6 | 1,9 | 1,9 | 2,5 | 0,76 | 5,0 | 1 | 1,9 |
| 12 | 3,1 | 3,1 | 3,6 | 1,1 | 6,8 | 1,4 | 4,3 |
| 24 | 4,2 | 4,2 | 3,9 | 1,2 | 10,5 | 2,1 | 8,8 |

[1]) Кажущаяся константа $K_a$ и число связывающих мест находили по графикам Скэтчарда [36].

[6]). Чувствительность матки к действию окситоцина становится максимальной ... концентра-

сродства матки к окситоцину через 24 ч более чем в 4 раза (табл. 4). За этот же промежуток времени число связывающих мест на матку возрастает в 2 раза по сравнению с контрольным уровнем (табл. 4). Можно полагать, что овариэктомия влияет на конформацию существующих мест связывания до того, как под действием ДЭС появятся новые связывающие места, поскольку сродство к гормону через 6 ч после введения ДЭС увеличивается, а число связывающих мест при этом не меняется (рис. 5).

Матка женщины реагирует на окситоцин в течение всей беременности. Чувствительность матки к этому гормону повышается по мере развития беременности и достигает максимума непосредственно перед [63] или во время родов [64]. Возможно, это обусловлено увеличением концентрации эстрогенов в крови во время беременности [65], и сигналом для начала родов является не само по себе увеличение концентрации окситоцина в крови, а способность матки реагировать на это увеличение.

## VIII. СВЯЗЫВАНИЕ ОКСИТОЦИНА В ЭНДОМЕТРИИ

Увеличение связывания окситоцина в матке после обработки животных ДЭС побудило нас изучить изменения окситоцинсвязывающей активности, происходящие во время эстрального цикла, когда меняются концентрации эндогенных эстрогенов. Связывание окситоцина фракцией частиц миометрия овец на 4—5 день после эструса (при общей продолжительности цикла 16—17 дней) было настолько низким, что точно его измерить оказалось невозможным. Вместе с тем окситоцин связывался с миометрием (кажущаяся $K_d = 6 \cdot 10^{-10}$ М), полученным от овец непосредственно перед эструсом. Исходя из этих предварительных результатов, предполагают, что эндогенные эстрогены играют какую-то роль в связывании окситоцина миометрием.

$^3$H-окситоцин связывался также фракцией частиц эндометрия овец в стадии, непосредственно предшествующей эструсу. Эндометрий и миометрий обладают одинаковым сродством к окситоцину (рис. 6). У овец на четвертый и пятый день цикла связывание окситоцина эндометрием и миометрием было одинаково низким. Предварительные исследования Робертса и др. [32] показали наличие четкой корреляции между сродством эндометрия к окситоцину и количеством простагландина $F_{2\alpha}$ (ПГ$F_{2\alpha}$), синтезируемого этой тканью в ответ на окситоцин. Эти данные согласуются с шестикратным увеличением концентрации ПГ$F_{2\alpha}$ в крови, взятой из нижней полой вены через 5 мин после введения окситоцина овцам, обработанным эстрогеном на стадии анэструса, когда содержание эстрогенов в крови велико [66]. Простагландинподобная активность обнаруживается также в среде после инкубации матки крыс с окситоцином [67]. Тот факт, что ПГ$F_{2\alpha}$ оказывает у овец лютеолитическое действие [68—70], возможно, объясняет угнете-

ние функции желтого тела у телок под влиянием окситоцина [71, 72]. Однако вопрос о том, является ли окситоцин физиологическим регулятором активности желтого тела, остается нерешенным.

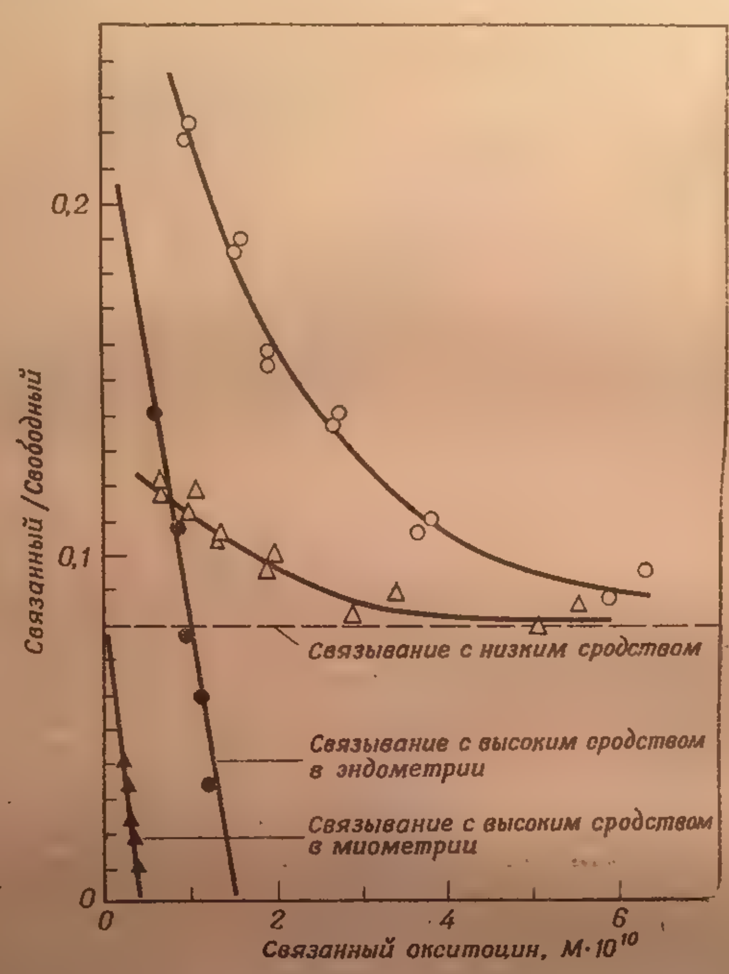



**Рис. 6.** Скэтчардовский график связывания $^3$H-окситоцина с фракцией частиц, полученных из эндометрия и миометрия овец на 15-й день эстрального цикла. Нелинейная форма графиков (△ и ○)свидетельствует о наличии более чем одного класса связывающих мест. Связывание с местами, имеющими высокое сродство, в препаратах эндометрия (●) и миометрия (▲) было установлено после учета поправок на связывание с местами, имеющими низкое сродство (штриховая линия, полученная по данным инкубации частиц с $^3$H-окситоцином и 0,1 мкМ нерадиоактивным окситоцином) [32].

## IX. МЕТАБОЛИЗМ ОКСИТОЦИНА

Многие ткани содержат ферменты, способные инактивировать окситоцин (см. обзор [73]). Тем не менее окситоцин, по-видимому, метаболизируется при инкубации в течение 1 ч с фракцией частиц молочной железы [29]. В то же время при часовой инкубации с $^3$H-окситоцином окситоцинсвязывающая активность фракции частиц миометрия уменьшается на 20—40% (по данным 5 экспериментов) [30]. Уменьшение связывающей активности было отмечено при инкубации препарата частиц клеток матки в среде, в которой предварительно в течение 1 ч выдерживали другой аналогичный

препарат [30]. Природа метаболита, действующего на связывание, еще не изучена, найдено лишь, что при тонкослойной хроматографии он имеет такое же значение $R_f$, как окситоцин [30].

Данные о том, что в препаратах частиц окситоцин почти не подвергается метаболизму, подтверждают наблюдения о локализации активности окситоциназы молочной железы [74, 75] и матки [51] главным образом во фракциях цитозоля.

## X. ДРУГИЕ ТКАНИ-МИШЕНИ ОКСИТОЦИНА

### А. Амфибии

Гормоны нейрогипофиза стимулируют увеличение гидроосмотической проницаемости плазматических мембран и активный транспорт натрия клетками кожи и мочевого пузыря амфибий (см. обзор [76]). Эти эффекты, по-видимому, опосредованы гормонспецифической аденилатциклазой [77—79]. Бокаэрт и др. [25, 26] пришли к выводу о том, что окситоцинсвязывающие места в клетках эпителия кожи лягушки являются рецепторами этого гормона, поскольку связывание гормона предшествует биологическому ответу — переносу натрия; кажущаяся $K_d$ для гормон-рецепторного комплекса сравнима с концентрацией гормона, которая необходима для получения полумаксимального ответа, определяемого по переносу натрия; лигандная специфичность некоторых аналогов окситоцина соответствует величине их биологического ответа. Эти исследователи показали также, что кажущаяся $K_d$ для связывания окситоцина препаратами частиц клеток эпителия мочевого пузыря лягушки, равная $2{,}5 \cdot 10^{-7}$ М, приблизительно соответствует концентрации окситоцина, приводящей к полумаксимальной стимуляции активности аденилатциклазы [34].

### Б. Жировые клетки

Окситоцин стимулирует окисление глюкозы в изолированных жировых клетках [28, 80—82]. Однако необходимая для этого молярная концентрация окситоцина должна быть приблизительно в 1000 раз больше концентрации инсулина, и в сравнении с инсулином максимальный эффект, производимый окситоцином, значительно меньше [82]. Поэтому окситоцин, вероятно, не является физиологическим регулятором метаболизма в жировых клетках. Томпсон и др. [28] обнаружили, что концентрация окситоцина, при которой наблюдается полная утилизация глюкозы, составляет $4 \cdot 10^{-8}$ М. Иодирование гормона снижает максимальный ответ на 20—25%. $^{125}$I-окситоцин связывается изолированными жировыми клетками, но не препаратами матки, мозгового слоя почек или мочевого пузыря лягушки [28].

### В. Самцы

В задней доле гипофиза самцов содержится почти столько же окситоцина, сколько и у самок, однако физиологическая роль этого гормона у самцов не вполне понятна [83]. Активность окситоцина обнаруживается в крови при стимуляции половых органов самцов некоторых видов животных [83—85], а также во время и после эякуляции у самцов морской свинки [86] и быков [83] соответственно. Возможно, окситоцин играет определенную роль в транспорте спермы, поскольку этот гормон приводит к увеличению сокращаемости семяпровода [87] и эпидидимиса [87—89]. Нам не удалось обнаружить связывания окситоцина препаратами частиц клеток семяпровода, эпидидимиса, вентральной предстательной железы, семенных пузырьков и семенников крыс [27].

## XI. МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ОКСИТОЦИНА

### А. Циклический АМФ

Хотя действие гормонов нейрогипофиза на кожу и мочевой пузырь амфибий и почки млекопитающих опосредовано цАМФ [34, 71—79, 83, 90—93], в матке окситоцин не оказывает никакого влияния на цАМФ [94, 95]. Тем не менее цАМФ, по-видимому, опосредует расслабление матки, вызываемое β-адренергическими агонистами [94—102]. Сокращения матки, индуцируемые окситоцином, ингибируются адреналином, цАМФ и дибутирил-цАМФ [98], но не дибутирил-циклическими производными ГМФ, ИМФ, и УМФ [99]. Хотя цАМФ и может выступать в роли антагониста окситоцина, последний не устраняет эффектов цАМФ. Например, окситоцин не ингибирует увеличения содержания цАМФ [94, 100] и активности аденилатциклазы в матке [102], стимулируемых адреналином и изопротеренолом соответственно. Более того, повышенная под влиянием изопротеренола концентрация цАМФ в ткани матки не изменяется и при сокращении матки, вызванном добавлением в инкубационную среду окситоцина [100]. На основании этого было высказано предположение [100] о том, что концентрация цАМФ в матке не является первостепенным фактором, определяющим сократимость этого органа. Понимание роли цАМФ осложняется характером действий простагландинов серии Е(ПГЕ), которые стимулируют, с одной стороны, сокращения матки, а с другой — активность аденилатциклазы [94, 95, 102]. Это явное противоречие относительной роли цАМФ в механизме действия цАМФ на расслабление миометрия было бы устранено, если бы удалось показать, что адреналин- и ПГЕ-стимулируемые аденилатциклазы находятся в разных компартментах клетки [94, 95, 102].

Расслабление матки, индуцируемое цАМФ, может быть обусловлено увеличением связывания кальция саркоплазматической

сетью в клетках матки, как это предполагается в отношении гладких мышц кишечника [103]. Связывание $Ca^{2+}$ могут регулировать цАМФ-зависимые киназы, которые транслоцируются из цитозоля препаратов матки во фракции микросом в ответ на обработку изопротеренолом [104]. цАМФ может также уменьшать внутриклеточную концентрацию кальция, стимулируя его освобождение из мышечных клеток матки [105].

Имеются данные, свидетельствующие о том, что сокращение гладких мышц сопровождается увеличением концентрации цГМФ [106—108]. Роль цГМФ пока не ясна, но, возможно, она связана с цГМФ-зависимыми протеинкиназами, катализирующими эндогенное фосфорилирование двух белков микросомной фракции, полученной из клеток матки морских свинок [109].

## Б. Кальций

Внутриклеточный $Ca^{2+}$, по-видимому, регулирует механическую активность гладких мышц матки и миоэпителиальных клеток. При отсутствии кальция в инкубационной среде изолированные матка и кусочки ткани молочной железы не дают ответа на окситоцин [41—44, 46]. Такие соединения с окситоциноподобной активностью, как ацетилхолин, вероятно, повышают содержание $Ca^{2+}$ в миоплазме изолированной матки при деполяризации, увеличивая проникновение кальция в клетку из окружающей среды [110]. Расслабление миометрия может быть связано с процессом противоположного характера, поскольку при расслаблении, вызванном изопротеренолом, дибутирил-цАМФ или папаверином (ингибитором фосфодиэстеразы, гидролизующей циклические нуклеотиды), концентрация внутриклеточного $Ca^{2+}$ уменьшается [105]. Результаты ряда исследований (см. обзор [111]) позволяют предположить, что проникновение $Ca^{2+}$ в клетки гладких мышц из окружающей среды или внутриклеточная концентрация $Ca^{2+}$, освободившегося из связанного состояния, регулируются проницаемостью плазматических мембран. Окситоцин может индуцировать увеличение проницаемости мембран по отношению к $Ca^{2+}$ посредством взаимодействия с рецепторами, расположенными на поверхности клетки. Поскольку концентрация $Ca^{2+}$ за пределами клетки намного больше, чем внутри [112—115], увеличение проницаемости мембран должно приводить к проникновению кальция в миоплазму благодаря наличию электрохимического градиента. В миоплазме $Ca^{2+}$ должен связываться с регуляторным белком, например тропонином [116], и инициировать сокращение. По-видимому, в расслаблении миометрия принимает участие кальцийвыталкивающий насос [117, 118], ассоциированный с плазматической мембраной [119].

$Ca^{2+}$, освобождаемый из внутриклеточных депо, очевидно, также принимает участие в сокращениях матки. Аронсон и Батра [120] показали, что деполяризованная матка женщины при инку-

бации в среде, лишенной $Ca^{2+}$, сокращается в ответ на ацетилхолин, хотя амплитуда этих сокращений в отсутствие $Ca^{2+}$ значительно снижена. Карстен [121] обнаружил, что связывание $Ca^{2+}$ с фрагментированной саркоплазматической сетью [122, 123] матки коров является АТФ-зависимым процессом. Связывание $Ca^{2+}$ подавляется окситоцином и вызывающими сокращение матки простагландинами, но не инактивированным ПГF$_{1\beta}$. Подобное подавление зависит от дозы добавляемого агента; полумаксимальное подавление связывания $Ca^{2+}$ препаратами матки коровы в последней трети беременности наблюдается при концентрации около 500 нЕд окситоцина в 1 мл, что приблизительно соответствует $1 \cdot 10^{-12}$ М гормона. Полумаксимальное подавление в препаратах матки небеременных коров имеет место при концентрации окситоцина приблизительно $1 \cdot 10^{-9}$ М. Более высокое сродство к окситоцину, обнаруживаемое в препаратах матки беременных коров, соответствует более высокой чувствительности матки к окситоцину во время беременности [63, 64].

Результаты, полученные Карстеном, позволяют предположить, что окситоцин, ПГЕ$_2$ и ПГF$_{2\alpha}$ вызывают сокращение матки, стимулируя освобождение кальция из саркоплазматической сети. В исследованиях, подобных проведенным Карстеном, было установлено, что ангиотензин II усиливает освобождение кальция из микросомных мембран, выделенных из аорты кролика [124]. Показано, что брадикинин также стимулирует освобождение кальция из микросомной фракции, выделенной из коронарной артерии свиньи [125]. Повышение концентрации $Ca^{2+}$ в миоплазме, вызываемое гормоном, может приводить к активации сокращения за счет ингибирования тропонина. Точный механизм, с помощью которого соединения с окситоцинподобной активностью, воздействуя на поверхность клетки, освобождают $Ca^{2+}$ из внутриклеточных депо, пока еще не известен.

Итак, окситоцин может увеличить поступление внеклеточного $Ca^{2+}$ и стимулировать освобождение этого иона из внутриклеточных депо. Источник поступления $Ca^{2+}$, по-видимому, определяется электрохимическим состоянием матки. Например, внеклеточный $Ca^{2+}$, очевидно, стимулирует сокращение деполяризационного миометрия, тогда как внутриклеточный $Ca^{2+}$ стимулирует сокращение поляризованного миометрия [126]. Точные механизмы действия окситоцина еще предстоит установить. Фактически совершенно не изученным остается механизм действия этого гормона в лактирующей молочной железе.

**Благодарность**

Эти исследования были проведены при финансовой поддержке Национального института здравоохранения (контракт 69-2193 и субсидия HD8406).

Я благодарю Теодора Л. Шварца и Марту Моррисон за техническую помощь, д-ра Мориса Маннинга, сотрудника нашего отдела и Sandoz, Ltd. за предоставление синтетического окситоцина и его аналогов, которые были использованы на всех этапах проводимых исследований; д-ра Мюррей Саффрана, сотрудника нашего отдела, за поддержку данной работы и Синди Стэнли за помощь в оформлении рукописи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Due Vigneaud V., Ressler C., Swan J. M., Roberts C. W., Katsoyannis P. B., Gordon S.*, J. Am. Chem. Soc., *75*, 4879 (1953).
2. *Manning M.*, J. Am. Chem. Soc., *90*, 1348 (1968).
3. *Berde B., Boisonnas R. A.*, in: Neurophysial Hormones and Similar Polypeptides, Handbook of Experimental Pharmacology (B. Berde, ed.), Vol. 23, Springer-Verlag, New York, 1968, p. 802.
4. *Sawyer W. H., Manning M.*, Annu. Rev. Pharmacol., *13*, 5 (1973).
5. *Holton P.*, Br. J. Pharmacol., *3*, 328 (1948).
6. *Fitzpatrick R. J., Bentley P. J.*, in: Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides, Handbook of Experimental Pharmacology (B. Berde, ed.), Vol. 23, Springer-Verlag, New York, 1968, p. 190.
7. *Munsick R. A.*, in: Neurohypophysial Hormones and Sililar Polypeptides, Handbook of Experimental Pharmacology (B. Berde, ed.), Vol. 23, Springer-Verlag, New York, 1968, p. 443.
8. *Mendez-Bauer C., Cabot H. M., Caldeyro-Barcia R.*, Science, *132*, 299 (1960).
9. *Smith M. W.*, Nature, *190*, 541 (1961).
10. *Rydén G., Sjöholm I., Br. J.* Pharmacol. Chemother., **19**, 136 (1962).
11. *Van Dongen C. G., Hayes R. L.*, Endocrinology, *78*, 1 (1966).
12. *Bisset G. W.*, in: Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides, Handbook of Experimental Pharmacology (B. Berde, ed.), Vol. 23, Springer-Verlag, New York, 1968, p. 475.
13. *Langer E., Huhn S.*, Z. Zellforsch. Abt. Histochem., 47, 507 (1958) (in German).
14. *Richardson K. C.*, Proc. R. Soc. Lond. Biol., *136*, 30 (1949).
15. *Linzell J. L.*, J. Anat., *86*, 49 (1952).
16. *Linzell J. L.*, J. Physiol. Lond., *130*, 257 (1955).
17. *Ginsburg M., Smith M. W.*, Br. J. Pharmacol., *14*, 327 (1959).
18. *Sjöholm I., Rydén G.*, Acta Endocrinol., *61*, 432 (1969).
19. *Agishi Y., Dingman J. F.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *18*, 92 (1965).
20. *Morgat J. L., Hung L. T., Cardinaud R., Fromageot P., Bockaert J., Imbert M., Morel F.*, J. Labelled Compd., *6*, 276 (1970).
21. *Soloff M. S., Swartz T. L., Saffran M.*, Endocrinology, *91*, 213 (1972).
22. *Egan S. M., Livingston A., J.* Endocrinol., *58*, 289 (1973).
23. *Soloff M. S., Rees H., Sar M., Stumpf W. E.*, Endocrinology, *96*, 1475 (1975).
24. *Soloff M. S., Swartz T., Morrison M., Saffran M.*, Endocrinology, *92*, 194 (1973).
25. *Bockaert J., Jard S., Morel F., Montegut M.*, Am. J. Physiol., **219**, 1514 (1970).
26. *Bockaert J., Imbert M., Jard S., Morel F.*, Mol. Pharmacol., *8*, 230 (1972).
27. *Soloff M. S.*, in: Methods in Receptor Research, Methods in Molecular Biology (M. Blecher, ed.), Marcel Dekker, New York, 1976.
28. *Thompson E. E., Freychet P., Roth J.*, Endocrinology, *91*, 1199 (1972).
29. *Soloff M. S., Swartz T. L.*, J. Biol. Chem., *248*, 6471 (1973).
30. *Soloff M. S., Swartz T. L.*, J. Biol. Chem., *249*, 1376 (1974).
31. *Soloff M. S., Swartz T. L., Steinberg A. H.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *38*, 1052 (1974).
32. *Roberts J. S., McCracken J. A., Gavagan J. E., Soloff M. S.*, в печати.
33. *Soloff M. S.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *66*, 671 (1975).

34. *Roy C., Backaert J., Rajerison R., Jard S.*, Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett., *30*, 329 (1973).
35. *Soloff M. S.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *65*, 205 (1975).
36. *Scatchard G., Ann. N. Y.* Acad. Sci., *51*, 660 (1949).
37. *Rosenthal H. E.*, Anal. Biochem., *20*, 525 (1967).
38. *Follett B. K., Bentley P. J.*, J. Endocrinol., *29*, 277 (1964).
39. *Robinson I. C. A. F., Walker J. M.*, Br. J. Pharmacol., *50*, 409 (1974).
40. *Sawyer W. H., Wuu T. C., Baxter J. W. M., Manning M.*, Endocrinology, *85*, 385 (1969).
41. *Coutinho E. M., Csapo A.*, J. Gen. Physiol., *43*, 13 (1959).
42. *Berger E., Marshall J. M.*, Am. J. Physiol., *201*, 931 (1961).
43. *Marshall J. M., Csapo A.*, Endocrinology, *68*, 1026 (1961).
44. *Kuriyama H., Csapo A.*. Endocrinology, *68*, 1010 (1961).
45. *Jung H.*, in: Oxytocin (R. Caldeyro-Barcia and H. Heller, eds.), Pergamon Press, London, 1961, p. 87.
46. *Moore R. D., Zarrow M. X.*, Acta Endocrinol., *48*, 186 (1965).
47. *Cuatrecasas P.*, Annu. Rev. Biochem., *43*, 169 (1974).
48. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.*, J. Biol. Chem., *193*, 265 (1951).
49. *Weaver R. A., Boyle W.*, Biochem. Biophys. Acta, *173*, 377 (1969).
50. *Kidwai A. M., Radcliffe M. A., Daniel E. E.*, Biochim. Biophys. Acta, *233*, 538 (1971).
51. *Rufeger U., Tellhelm B., Kroker R.*, Comp. Biochem. Physiol., *47B*, 255 (1974).
52. *Bentley P. J.*, J. Endocrinol., *30*, 103 (1964).
53. *Munsick R. A.*, Endocrinology, *66*, 451 (1960).
54. *Munsick R. A., Jeronimus C.*, Endocrinology, *76*, 90 (1965).
55. *Clegg P. C., Hopkinson P., Pickles V. R.*, J. Physiol. Lond., *167*, 1 (1963).
56. *Bentley P. J.*, J. Endocrinol., *32*, 215 (1965).
57. *Somlyo A. V., Woo C., Somlyo A. F.*, Am. J. Physiol., *210*, 705 (1966).
58. *Fitzpatrick R. J.*, in: Oxytocin (R. Caldeyro-Barcia and H. Heller, eds.), Pergamon Press, New York, 1961, p. 358.
59. *Flatters, M.*, Arch. Exp. Pathol. Pharmakol., *221*, 171 (1954) (in German).
60. *Schneider W., Stumph C. L.*, Arch. Int. Pharmacodyn., *94*, 406 (1953) (in German).
61. *Guerne J. M., Stutinsky F.*, J. Physiol. (Paris), *53*, 357 (1961) (in French).
62. *Chan W. Y., O'Connell M., Pomeroy S. R.*, Endocrinology, *72*, 279 (1963).
63. *Caldeyro-Barcia R., Sereno J. A.*, in: Oxytocin (R. Caldeyro-Barcia and H. Heller, eds.), Pergamon Press, New York, 1961, p. 177.
64. *Theobald G. W.*, in: Oxytocin (R. Caldeyro-Barcia and H. Heller, eds.), Pergamon Press, New York, 1961. p. 212.
65. *Sybulski S., Maughan G. B.*, Am. J. Obstet. Gynecol., *113*, 310 (1972).
66. *Sharma S. C., Fitzüatrick R. J.*, Prostaglandins, *6*, 97 (1974).
67. *Chan W. Y.*, Life Sci., *14*, 2385 (1974).
68. *Barrett S., Blockley M. A., Brown J. M., Cumming I. A., Goding J. R., Mole B. J., Clist J. M.*, J. Reprod. Fertil., *24*, 136 (1971).
69. *McCracken J. A., Ann. N. Y.* Acad. Sci., *180*, 456 (1971).
70. *Thorburn G. D., Nicol D. H.*, J. Endocrinol., *51*, 785 (1971).
71. *Armstrong D. T., Hansel W. J.*, Dairy Sci., *42*, 533 (1959).
72. *Harms P. G., Niswender G. D., Malven P. V.*, Biol. Reprod., *1*, 228 (1969).
73. *Tuppy H.*, in: Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides, Handbook of Experimental Pharmacology (B. Berde, ed.), Vol. 23, Springer-Verlag, New York, 1968, p. 67.
74. *Werle E., Maier L.*, Naturwissenschaften, *41*, 380 (1954) (in German).
75. *Suska-Brzezińska E., Golebska M., Ewy Z.*, Acta Physiol. Pol., *16*, 124 (1965).
76. *Morel F., Jard S.*, in: Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides, Handbook of Experimental Pharmacology (B. Berde, ed.), Vol. 23, Springer-Verlag, New York, 1968, p. 655.
77. *Orloff T., Handler T. S.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *5*, 63 (1961).
78. *Bär H. P., Hechter O., Schwartz I. L.*, Walter R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *67*, 7 (1970).

79. *Hynie S., Sharp G. W. G.*, Biochim. Biophys. Acta. *230*, 40 (1971).
80. *Mirsky I. A.*, in: Neurohypophysial Hormones and Similar Polypeptides, Handbook of Experimental Pharmacology.
81. *Braun T., Hechter O., Rudinger J.*, Endocrinology, *85*, 1092 (1969).
82. *Fain J. N., Loken S. C.*, J. Biol. Chem., *244*, 3500 (1969).
83. *Sharma O. P., Hays R. L.*, J. Reprod. Fertil., *35*, 359 (1973).
84. *Debackere M., Peeters G., Tuytten N., J.*, Endocrinol., *22*, 321 (1961).
85. *Бережнев А. П.*, Вестник сельскохоз. наук ВАСХНИЛ, *20*, 519 (1972).
86. *Barowicz T., Wojcik K., Ewy Z., Wierzchos E.*, Bull. Acad. Polon. Sci., *20*, 519 (1972).
87. *Melin P.*, J. Reprod. Fertil., *22*, 283 (1970).
88. *Knight T. W.*, J. Reprod. Fertil., *28*, 141 (1972).
89. *Hib J.*, J. Reprod. Fertil., *36*, 191 (1974).
90. *Campbell B. J., Woodward G., Borberg V.*, J. Biol. Chem., *247*, 6167 (1972).
91. *Bockaert J., Roy C., Jard S.*, J. Biol. Chem., *247*, 7073 (1972).
92. *Neer E. J.*, J. Biol. Chem., *248*, 4775 (1975).
93. *Bockaert J., Roy C., Rajerison R., Jard S.*, J. Biol. Chem., *248*, 5922 (1973).
94. *Harbon S., Clauser H.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *44*, 1496 (1971).
95. *Vesin M.-F., Harbon S.*, Mol. Pharmacol., *10*, 457 (1974).
96. *Dobbs J. W., Robison G. A.*, Fed. Proc., *27*, 352 (1968).
97. *Triner L., Vulliemoz Y., Verosky M., Nahas G. G.*, Life Sci., *9*, 707 (1970).
98. *Mitznegg P., Heim F., Meythaler B.*, Life Sci., *9*, 121 (1970).
99. *Mitznegg P., Bach B., Heim F.*, Life Sci., *10*, 1285 (1971).
100. *Polacek I., Daniel E. E.*, Can. J. Physiol. Pharmacol., *49*, 988 (1971).
101. *Polacek I., Bolan J., Daniel E. E.*, Can. J. Physiol. Pharmacol., *49*, 999 (1971).
102. *Bhalla R. C., Sanborn B. M., Korenman S. G.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 3761 (1972).
103. *Anderson R., Nilsson K.*, Nature [New Biol], *238*, 119 (1972).
104. *Korenman S. G., Bhalla R. C., Sanborn B. M., Stevens R. H.*, Science, *183*, 430 (1974).
105. *Marshall J. M., Kroeger E. A.*, Phil. Trans. Roy. Soc. Lond., *B265*, 135 (1973).
106. *Goldberg N. D., O'Dea R. F., Haddox M. K.*, in: Adv. Cyclic Nucleotide Res., *3*, 55 (1973).
107. *Schultz G., Hardman J. G., Schultz K., Davis J. W., Sutherland E. W.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *70*, 1721 (1973).
108. *Schultz G., Hardman J. G., Schultz K., Baird C. E., Sutherland E. W.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *70*, 3889 (1973).
109. *Casnellie J. E., Greengard P.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *71*, 1891 (1974).
110. *Van Breeman C., Daniel E. E.*, J. Gen Physiol., *49*, 1299 (1967).
111. *Hurwitz L., Suria A.*, Annu. Rev. Pharmacol., *11*, 303 (1971).
112. *Van Breemen C., Daniel E. E., van Breemen D.*, J. Gen. Physiol., *49*, 1265 (1966).
113. *McNamara D. B., Sulakhe P. V., Dhalla N. S.*, Biochem. J., *125*, 525 (1971).
114. *Rasmussen H.*, Science, *170*, 404 (1970).
115. *Sonnenblick E. H., Stam A. C., Jr.*, Annu. Rev. Physiol., *31*, 647 (1969).
116. *Ebashi S., Endo M.*, Prog. Biophys. Mol. Biol., *18*, 123 (1968).
117. *Goodford P. J.*, J. Physiol. Lond. *176*, 180 (1965).
118. *Goodford P. J.*, in: Muscle (W. M. Paul, E. E. Daniel, Kay, C. M. and G. Monckton, eds.), Pergamon Press, New York, 1965, p. 219.
119. *Hurwitz L., Fitzpatrick D. F., Debbas G., Landon E. J.*, Science, *179*, 385 (1973).
120. *Aronson S., Batra S.*, Experientia, *30*, 768 (1974).
121. *Carsten M. E.*, Prostaglandins, *5*, 33 (1974).
122. *Ross R., Klebanoff S. J.*, J. Cell Biol., *32*, 155 (1967).
123. *Devine C. E., Somlyo A. V., Somlyo A. P.*, Phil. Trans. R. Soc. Lond., *B265*, 17 (1973).
124. *Baudouin M., Meyer P., Fernandjian S., Morgan J. L.*, Nature, *235*, 336 (1972).
125. *Zelck U., Konya L., Albrecht E.*, Acta Biol. Med. Germ., *32*, K1 (1974).
126. *Hodgson B. J., Daniel E. E.*, Can. J. Physiol. Pharmacol., *51*, 914 (1973).

Глава 7

# СВОЙСТВА РЕЦЕПТОРОВ ФОЛЛИКУЛОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ГОРМОНА В ТКАНИ ГОНАД КРЫС

*Л. РЕЙХЕРТ И Х. АБУ-ИССА*

Department of Biochemistry
Division of Basic Health Sciences
Emory University
Atlanta, Georgia

## I. ВВЕДЕНИЕ

Наши представления о значении фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) для регуляции физиологических функций у крыс за последние годы значительно расширились. Так, было обнаружено, что у самцов крыс ФСГ стимулирует секрецию андроген-связывающего белка [1, 2]. Накопление подробных сведений об эффектах ФСГ на семенники неполовозрелых и половозрелых крыс, которые во времени следуют за связыванием гормона, способствовало возникновению самых разнообразных направлений в эспериментальной эндокринологии ФСГ [1, 2, 48]. Что касается действия ФСГ у самок крыс, то следует отметить данные, свидетельствующие о том, что при введении ФСГ in vivo этот гормон может индуцировать или активизировать в гранулезных клетках яичников рецепторы лютеинизирующего гормона (ЛГ) [3]. Предварительные результаты, полученные в нашей лаборатории, позволяют предполагать существование аналогичного эффекта ФСГ на рецепторы ЛГ в семенниках крыс. И все же важнейшим пусковым этапом в механизме действия ФСГ на ткани-мишени остается его взаимодействие с гормоноспецифическими рецепторами, связанными с клеточными мембранами. В настоящей главе будут представлены результаты наших последних исследований, предпринятых с целью получения более подробной информации о взаимодействии ФСГ с рецепторами семенников половозрелых крыс.

## II. ИОДИРОВАНИЕ ФСГ ЧЕЛОВЕКА

Важным условием для работ по изучению взаимодействия любого гормона с его специфическим рецептором является наличие подходящего метода введения радиоактивного изотопа в состав гормона при сохранении биологической активности последнего. В качестве неферментативного метода введения радиоактивного

иода в состав белков широко используется метод Гринвуда и др. [4, 5] с применением хлорамина Т. Ранее мы показали, что этот метод вполне применим для иодирования ЛГ человека при исследовании тканевых рецепторов этого гормона [6, 7] и при изучении взаимосвязи между его структурой и функциональной активностью [8]. При этом, однако, условия иодирования ЛГ отличались от тех условий, которые применялись для получения меченого гормона, использовавшегося в качестве лиганда в радиоиммунологическом методе определения ЛГ [9]. Опыт других исследователей также свидетельствует о том, что условия иодирования белка, пригодные для получения меченого лиганда, используемого при радиоиммунологических определениях, могут оказаться непригодными для получения того же самого меченого лиганда, предназначающегося для изучения тканевых рецепторов. В последнем случае для того, чтобы сохранить те особенности конформации белка, которые существенны для его специфического взаимодействия с имеющими биологическое значение рецепторными участками, требуются гораздо более мягкие условия иодирования.

Применение метода иодирования ФСГ с использованием хлорамина Т [4] может приводить к потере биологической активности этого гормона [10]. Миячи и др. [11, 12] для радиоиодирования ФСГ применили лактопероксидазный метод, обеспечивший сохранение биологической активности гормона. Вайтукайтису и др. [13] удалось получить тритированное производное ФСГ человека, сохранившее биологическую активность. Однако удельная радиоактивность полученного лиганда была слишком низка, и соответственно система, с которой работали эти исследователи, оказалась относительно малочувствительной. Баттом [14] был разработан интересный вариант иодирования ФСГ с помощью хлорамина Т, при котором удается избежать контакта ФСГ с хлорамином Т за счет выпаривания иода и его захвата раствором гормона. Однако о биологической активности полученного этим способом меченого ФСГ автор ничего не сообщает. Другой метод, который был успешно использован для ряда белковых гормонов, в том числе и для ЛГ, заключается в присоединении к белку ацетилирующего агента, содержащего $^{125}I$, например иодированного эфира N-оксисукцинимида 3-(оксифенол)пропионовой кислоты [15]. Недавно де Ляллоза и др. [16] сообщили об успешном тритировании ЛГ с помощью восстановительного метилирования. Однако ни один из двух последних методов не был использован для получения меченого ФСГ.

Следует подчеркнуть, что, хотя метод с использованием хлорамина Т и подвергался критике из-за возможности повреждения ФСГ во время стадий окисления и восстановления, данный недостаток присущ фактически всем существующим методам введения изотопной метки. Даже при использовании лактопероксидазного метода [12], считающегося гораздо более мягким и надежным, не-

обходимым условием является наличие перекиси водорода — агента, способного в принципе вызывать не меньшие нарушения в конформации белка, чем хлорамин Т. Недавно мы описали метод иодирования ФСГ человека, позволяющий сохранять биологическую активность гормона и его специфический захват рецепторами семенных канальцев крыс. Это было достигнуто благодаря применению хлорамина Т при тщательно контролируемых условиях [17, 18].

*Таблица 1*

**Условия иодирования ФСГ человека с помощью хлорамина Т**

| Метод | ФСГ, мкмоль[1] | Молярное отношение ФСГ человека/хлорамин Т | Температура, °С | Время[2], с | $^{125}$I Na, мКи | pH | Удельная радиоактивность, мкКи/мкг |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Батт [10] | $1,5 \cdot 10^{-4}$ | 1:2372 | — | 60 | 2,4 | 7,5 | — |
| Миячи и др. [12] | $6,0 \cdot 10^{-5}$ | 1:1482 | Комнатная | 60 | 1 | 7,8[3] | — |
| См. настоящее сообщение [17, 18] | $1,5 \cdot 10^{-3}$ | 1:15,8 | 4 | 30 | 1 | 7,5 | 9,5 |

[1] Мол. вес ФСГ человека принимали равным 33 000.
[2] Время реакции до добавления метабисульфита.
[3] Иодирование проводили в присутствии 0,15 М NaCl.

Наиболее важные детали разработанной нами процедуры значительно отличаются от условий, которые были использованы другими авторами (табл. 1) и которые явились причиной отрицательных выводов этих исследователей относительно применимости данного метода для получения меченого ФСГ. Главными особенностями нашей модификации являются чрезвычайно высокое молярное соотношение концентраций гормона и хлорамина Т (1 : 15), относительно небольшое время реакции с хлорамином Т до ее остановки метабисульфитом [(30 с) и низкая температура (4° С)]. Удельная радиоактивность конечного продукта составляет около 10 мкКи на 1 мкг белка. Полученное производное было использовано для разработки метода определения ФСГ с помощью тканевых рецепторов [19]. Впоследствии этот метод был с успехом применен в исследованиях по изучению характеристик гормон-рецепторного взаимодействия в семенных канальцах крыс [17], а также при изучении кинетики ассоциации [20] и диссоциации [21] нативных и модифицированных молекул ФСГ.

Следует подчеркнуть, что процедура иодирования, основные этапы которой отражены в табл. 1, а более детальное описание дано в оригинальных работах [18, 19], была разработана для ФСГ человека. Нельзя сказать заранее, будут ли молекулы ФСГ других видов вести себя при данных условиях иодирования так же, как молекулы ФСГ человека.

Необходимо помнить, что ссылки на сохранение биологической активности меченых производных ФСГ человека, как, впрочем, и любого другого биологически активного белка, следует оценивать по количеству метки, включенной в получаемый лиганд. Выявление повреждений в слабо меченных препаратах гормона с помощью биологических методов, требующих проведения экспериментов in vivo, может оказаться чрезвычайно сложной задачей. Для белка с мол. весом около 30 000 бóльшая часть молекул лиганда будет содержать метку при удельной радиоактивности около 40 мкКи/мкг. Очевидно, что в использованных нами препаратах ФСГ человека, обладавших удельной радиоактивностью 10 мкКи/мкг, метку содержали не все молекулы гормона. Поэтому, учитывая низкую точность результатов, присущую биологическим методам тестирования на целом организме, вполне допустимо, что все меченые молекулы гормона повреждены, но эти повреждения не выявляются при биологическом тестировании. В подобных условиях чрезвычайно важное значение приобретают понятия специфического и неспецифического захвата. Если мы обозначим суммарное количество импульсов, связанных препаратом рецепторов, как $B_t$, а общее количество импульсов, связанных рецепторным препаратом в присутствии избытка немеченого гормона, как $B_n$, то $B_t$—$B_n$ будет представлять собой специфический захват гормона, а $B_n$ — неспецифический. Доля специфического захвата определяется из уравнения $(B_t - B_n)/B_t \cdot 100$. Величина $B_n$ (неспецифического захвата) служит показателем повреждения гормона, и если в данных условиях определения тканевых рецепторов она оказывается недопустимо высокой, то пригодность полученного меченого лиганда ставится под вопрос. При слабом включении метки в лиганд, как в случае ФСГ человека, неспецифический захват может быть высоким, а заметной потери биологической активности лиганда in vivo не происходит. Но это еще не все. Следует учитывать, что необычно высокий уровень $B_n$ может быть обусловлен не только химическими повреждениями гормона в процессе введения метки, но и разрушением рецепторов при подготовке ткани к исследованию, а также обоими этими факторами одновременно.

## III. РЕЦЕПТОРЫ В ТКАНИ ГОНАД КРЫС

### А. Рецепторы в семенниках крыс

В биохимических свойствах и в гормональной чувствительности семенных канальцев, полученных из семенников неполовозрелых и половозрелых крыс, имеются значительные различия [2]. В первую очередь это относится к стимулируемым ФСГ протеинкиназной [22] и аденилатциклазной активностям [48]. Однако и большинство других известных биохимических эффектов ФСГ на се-

менники крыс, как оказалось, также зависит от возраста: эти эффекты, как правило, наиболее выражены у неполовозрелых животных и снижаются после 21-го дня жизни [23]. Тем не менее специфические для ФСГ рецепторы в семенных канальцах были обнаружены в нашей [17, 19] и других лабораториях [24, 49, 50] как у неполовозрелых, так и у половозрелых крыс. В исследованиях по определению тканевых рецепторов, их солюбилизации и получению мембранных фракций для более точного изучения гормон-рецепторного взаимодействия мы выбрали семенники половозрелых (весом 250—300 г) крыс из-за их большей массы. Следует, однако, помнить, что, поскольку ответ семенников на ФСГ зависит от возраста, то между самими рецепторами семенников половозрелых и неполовозрелых крыс или же между природой взаимодействий гормонов с рецепторами семенников животных разных возрастных групп, имеются, по-видимому, существенные различия.

Есть несколько способов получения препаратов из семенников крыс, способных, как было показано, служить источником рецепторов ФСГ. Сюда относится приготовление гомогенатов целых семенников, гомогенатов фракций, обогащенных с помощью фильтрации и промывки семенными канальцами [17], а также мембранных фракций из тонкоизмельченных семенных канальцев [25], выделяемых центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Большинство препаратов семенных канальцев связывает и ЛГ, и ФСГ, что может указывать на присутствие рецепторов для обоих этих гормонов. Данная концепция не является общепринятой [26], но она не противоречит многим из опубликованных наблюдений. Например, Манцини и др. [27] сообщили, что ЛГ аккумулируется в клетках Лейдига, а ФСГ — в клетках Сертоли. Кьюэл и др. [28] наблюдали стимуляцию аденилатциклазы в изолированных семенных канальцах под действием ЛГ. Кристенсен и Мейсон [29] обнаружили, что превращать прогестерон в тестостерон способны и семенные канальцы, и клетки Лейдига, но в клетках Лейдига этот процесс протекает более интенсивно. При определении тканевых рецепторов ФСГ одновременное присутствие в препаратах рецепторов семенников специфических рецепторов и ЛГ, и ФСГ не имеет существенного значения [13, 14]. Однако в некоторых исследованиях желательно иметь препараты рецепторов ФСГ, как можно менее загрязненные рецепторами ЛГ.

Для приготовления изолированных семенных канальцев широко используется метод Кристенсена и Мейсона [29] с тонкоизмельченной тканью, при котором канальцы отделяют от остальных компонентов декапсулированных измельченных семенников крыс. Роммертс и др. [30] сообщили, что такие препараты тонкоизмельченных канальцев практически не содержат клеток Лейдига. Этот вывод основывался на отсутствии во фракции канальцев неспецифической эстеразы, наличие которой связывают с

клетками Лейдига. Тем не менее в наших экспериментах даже тщательно промытые тонкоизмельченные семенные канальцы крыс сохраняли способность специфически связывать ЛГ (табл. 2). Это указывает на то, что одной лишь многократной промывки, по всей видимости, недостаточно для полного удаления из препарата клеток Лейдига. Недавно мы разработали способ обработки промытых тонкоизмельченных семенных канальцев крыс с помощью гипотонического раствора (суспензия ка-

*Таблица 2*

**Захват $^{125}$I-ФСГ человека и $^{125}$I-ЛГ человека препаратами рецепторов из семенных канальцев крыс**

| Тип гомогената | $^{125}$I-ФСГ человека | | $^{125}$I-ЛГ человека | | Фенилэстераза, мкмоль за 1 мин на 1 мг белка |
|---|---|---|---|---|---|
| | специфический захват, (моль/мг белка)·$10^{-15}$ | специфическое связывание, % | специфический захват, (моль/мг белка)·$10^{-15}$ | специфическое связывание, % | |
| А. Канальцы, полученные с помощью тонкого измельчения и фильтрации через марлю | 1,43 | 77 | 3,6 | 78 | 0,89 |
| *Б.* Канальцы, полученные способом *А*, интенсивно промытые солевым раствором и буфером | 1,66 | 80 | 0,58 | 38 | Не выявляется |
| *В.* Канальцы, полученные способом *Б*, после обработки гипотоническим раствором | 2,01 | 78 | 0,19 | 20 | Не выявляется |

нальцев в 1 мМ буферном растворе *трис*-HCl, pH 7,5, содержащем 1 мМ $KHCO_3$ и 1 мМ $MgCl_2$, перемешивается в течение 2 мин на магнитной мешалке), который позволяет практически полностью избавиться от исходно значительного захвата иодированного ЛГ человека (табл. 2). Аналогичная обработка очищенных клеток Лейдига не снимает специфического захвата ими иодированного ЛГ человека. Следовательно, при данных условиях клетки Лейдига в препарате семенных канальцев не разрушаются, а удаляются. Полученные обработкой гипотоническим раствором канальцы оказались чрезвычайно удобными при исследовании связанных с мембранами рецепторов и при изучении характеристик гормон-рецепторного взаимодействия. Наличие рецепторов ЛГ в препаратах семенных канальцев является, пожалуй, не менее информативным показателем загрязнения клетками Лейдига, чем традиционные способы с привлечением световой и электронной микроскопии.

### Б. Рецепторы ФСГ в ткани яичников

О свойствах рецепторов ФСГ в ткани яичников известно относительно немного. Было показано, что ФСГ необходим для формирования полости фолликула, а в комплексе с ЛГ — для образования у гипофизэктомированных крыс желтого тела [42, 43]. Использование метода радиоавтографии in vitro позволило установить, что гранулезные клетки некоторых крупных фолликулов крыс способны связывать и $^{125}$I-хорионический гонадотропин (ХГ) человека, и $^{125}$I-ФСГ человека, тогда как клетки других фолликулов могут связывать только $^{125}$I-ФСГ человека [31]. Эксперименты с введением неполовозрелым крысам высокоочищенных препаратов крысиного ФСГ, слабо загрязненных ЛГ, дали результаты, подтверждающие предположение о том, что ФСГ может действовать на гранулезные клетки, индуцируя или активируя в них рецепторы ЛГ или ХГ [3]. Было показано, что введение гипофизэктомированным крысам ФСГ приводит к увеличению общего захвата яичниками $^{3}$H-ХГ человека [32]. Механизм стимулирующего действия ФСГ на предполагаемые рецепторы ЛГ гранулезных клеток неизвестен. Не известно также, является ли это увеличение количества рецепторов ЛГ результатом их демаскировки, активации или индукции. При добавлении in vitro немеченого ФСГ человека к гранулезным клеткам, выделенным из получавших растворитель контрольных крыс, увеличения связывания $^{125}$I-ХГ человека не происходило [3]. Поэтому стимулирующее действие ФСГ in vivo на связывание ХГ человека, очевидно, не обусловлено кооперативным эффектом связывания на уровне рецепторов. К моменту написания этой главы никаких данных относительно деталей взаимодействия ФСГ с гранулезными клетками в литературе не сообщалось.

В других исследованиях было обнаружено, что с ростом фолликулов в яичниках свиньи связывающая способность гранулезных клеток в отношении ХГ человека возрастает, а связывающая способность в отношении ФСГ снижается [33]. Таким образом, создается впечатление, что созревание гранулезных клеток характеризуется одновременным снижением количества участков связывания ФСГ и повышением способности связывать ХГ человека. Если это так, то гранулезная клетка может оказаться довольно сложной моделью для изучения химии взаимодействия ФСГ с рецепторами; в этом случае необходимо предварительно рассортировать гранулезные клетки из фолликулов разного размера и лишь после этого можно начинать выделять мембраны или изучать солюбилизацию рецепторов. Но вместе с тем выяснение изменений рецепторов, обусловливающих потерю способности специфически связывать ФСГ при созревании клетки, может, очевидно, иметь очень важное значение.

## IV. РЕЦЕПТОРЫ ФСГ В СЕМЕННЫХ КАНАЛЬЦАХ КРЫС

### А. Получение очищенных мембранных фракций из семенных канальцев крыс

Как подчеркнул Куатреказас [34], перед тем как начинать длительную и трудоемкую процедуру очистки мембран, часто бывает целесообразным провести предварительное изучение связывания на относительно неочищенных препаратах рецепторов. Значительная доля наших сведений об основных характеристиках взаимодействия ФСГ с рецепторами семенных канальцев семенников как раз и была первоначально получена с использованием гомогенатов целых семенников или гомогенатов очищенных семенных канальцев крыс. Из относительно очищенных гомогенатов семенных канальцев были получены препараты рецепторов, использованные для разработки метода определения ФСГ с помощью тканевых рецепторов [19], который в свою очередь был применен для изучения связи между структурой ФСГ и его функцией [20, 21]. Наши работы, выполненные на гомогенатах целых семенников и на гомогенатах фракций семенных канальцев, освобожденных от клеток Лейдига с помощью обработки гипотоническим раствором (см. выше), позволяют думать, что для фундаментальных исследований могут быть использованы препараты рецептора того и другого типа. Однако на определенном этапе развития исследований, касающихся гормон-рецепторного взаимодействия, неизбежно должны быть предприняты попытки выделить чистые фракции мембран. В этом плане семенные канальцы крыс обладают определенными преимуществами и недостатками. С одной стороны, с этой тканью чрезвычайно просто работать, поскольку ее анатомические и физические свойства позволяют легко отделить семенные канальцы от клеток Лейдига. Но, с другой стороны, масса ткани относительно невелика и можно заранее предсказать, что выход мембранных фракций будет весьма низким.

В настоящее время внимание исследователей сосредоточено на клетках Сертоли как наиболее вероятных клетках-мишенях для ФСГ у самцов крыс [2]. Доля клеток Сертоли в общей массе ткани семенных канальцев очень низка, и, кроме того, нет сколько-нибудь приемлемых методов выделения из ткани крыс чистых клеток Сертоли с хорошим выходом. Поэтому в качестве источника очищенных мембран, содержащих рецепторы, мы выбрали гомогенаты семенных канальцев, отделенных от клеток Лейдига. Следует помнить, что получаемая в конце концов фракция мембран состоит из смеси мембран клеток Сертоли, мембран канальцев и мембран сперматоцитов на различных стадиях развития. Но мы не ставили своей целью ответить на вопрос, какой

же именно компонент канальцев специфически связывает $^{125}$I-ФСГ. Нас в первую очередь интересовали параметры взаимодействия ФСГ с рецепторами мембран (клеток Сертоли), поскольку нам представлялось, что наличие в препарате, по всей вероятности, инертных фракций мембран не должно существенно повлиять на интерпретацию экспериментальных данных.

Плазматические мембраны мы получаем из семенных канальцев половозрелых крыс, предварительно очищенных от клеток Лейдига с помощью тонкого измельчения, промывки и обработки гипотоническим буферным раствором (разд. III). Для фракционирования субклеточных частиц мы используем модификацию метода Невилла [44]. Все операции проводятся при 4° С. После центрифугирования со скоростью 1500 g к содержащему рецепторы осадку семенных канальцев добавляется 5—7 объемов (по отношению к весу осадка) буфера 0,25 М сахароза—0,03 М *трис*-HCl—0,5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5. После этого ткань гомогенизируют в 5—10 приемов в гомогенизаторе Поттера со слабо притертым тефлоновым пестиком. Гомогенат центрифугируют в ступенчатом градиенте плотности сахарозы на роторе SW-27 в препаративной ультрацентрифуге Beckman L5-50. Градиенты готовятся в поликарбонатных пробирках емкостью 40 мл путем последовательного наслаивания 7 мл 50%-ной сахарозы ($d=1{,}23$), 7 мл 40%-ной сахарозы ($d=1{,}18$), 7 мл 37%-ной сахарозы ($d=1{,}16$) и 7 мл 30%-ной сахарозы ($d=1{,}13$). На поверхность градиента наслаивают 10 мл гомогената семенных канальцев, после чего проводят центрифугирование в течение 2 ч при 27 000 об/мин и температуре 5° С. Все растворы сахарозы готовятся на буфере 0,03 М *трис*-HCl—0,5 мМ $CaCl_2$, pH 7,5. Концентрация сахарозы во всех растворах выражена в весовых процентах; при необходимости растворы доводятся до нужной концентрации с помощью рефрактометра Абба при 25° С.

Центрифугирование гомогената семенных канальцев позволяет получить 4 белковые фракции и осадок. Первая фракция в верхней части пробирки с сахарозным градиентом, обозначаемая F1, представляет собой главным образом эндоплазматическую сеть. Фракции F2 и F3 являются фракциями плазматических мембран, которые седиментируют соответственно до границ слоев сахарозы с концентрациями 30—37% ($d=1{,}13$—$1{,}16$) и 37—40% ($d=1{,}16$—$1{,}18$). Четвертая фракция F4, состоящая главным образом из митохондрий, локализуется на границе слоев градиента с концентрациями сахарозы 40 и 50%. Осадок в основном содержит ядерный материал. Выход плазматических мембран весьма низок и составляет 0,6—0,8 мг на 1 г исходного материала, содержащего рецепторы (полученного в результате центрифугирования при 1500 g). Эта величина обычна для данного метода очистки мембран; близкие величины выхода материала были получены Полом и др. [45] при работе с мембранами печени

*Таблица 3*

**Характеристики мембранных фракций, получаемых из семенных канальцев крыс с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [1]**

| | Специфический захват $^{125}$I-ФСГ человека, (моль/мг белка)·$10^{-15}$ | 5′-нуклеотидаза, мкмоль/мг за 10 мин |
|---|---|---|
| Неочищенный гомогенат семенных канальцев | 5,2 | 0,44 |
| Микросомы F1 | 0,63 | 0,09 |
| Плазматические мембраны F2 | 31,6 | 3,6 |
| Плазматические мембраны F3 | 35,9 | 4,5 |
| Митохондрии F4 | 1,06 | 0,13 |
| Ядерный осадок F5 | 3,01 | 0,20 |

[1] Подробности техники выделения изложены в тексте.

и Корнфелдом и Симерсом [46], работавшими с мембранами тимоцитов.

Представленные в табл. 3 результаты показывают, что фракции F2 и F3 характеризуются наиболее высоким специфическим захватом $^{125}$I-ФСГ человека, который в пересчете на 1 мг тканевого белка приблизительно в семь раз превышает захват гормона неочищенным гомогенатом, содержащим рецепторы. Биохимический анализ свидетельствует о том, что фракции F2 и F3 состоят, по всей видимости, из высокоочищенных мембран. Эти фракции содержали основную долю выявляемой 5′-нуклеотидазной и АТФазной активности, но были лишены активности таких важных маркеров внутриклеточных структур, как глюкозо-6-фосфатаза (микросомы), сукцинатдегидрогеназа (митохондрии) и кислая фосфатаза (лизосомы). Фракции F1, F4 и F5 также специфически захватывали $^{125}$I-ФСГ человека, но гораздо слабее фракций F2 и F3. Наиболее вероятным объяснением этого факта является загрязнение фракций F1, F4 и F5 мембранами с большой поверхностью. Но нельзя также исключить возможности, что такой захват отражает существование важных в биологическом отношении внутриклеточных рецепторов ФСГ, как это предполагает Мак-Кернс [47] для ЛГ и ХГ человека.

### Б. Химический и ферментативный анализ свойств рецепторов ФСГ семенных канальцев семенников крыс

Для получения основных сведений о природе гормон-рецепторного взаимодействия были предприняты исследования по химической и ферментативной модификации рецепторов ФСГ в гомогенатах и в очищенных мембранных фракциях семенных канальцев половозрелых крыс, получаемых, как описано в разд.

*Таблица 4*

**Влияние ферментативной и химической модификации рецепторов семенников крыс на специфический захват $^{125}$I-ФСГ человека**

| Воздействие[1] | Влияние на специфический захват |
|---|---|
| 1. Протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин, проназа, коллагеназа) | Уменьшение |
| 2. РНКаза и(или) ДНКаза | Отсутствие влияния |
| 3. Нейраминидаза | ~2-кратное увеличение |
| 4. Фосфолипаза А или С | Уменьшение (зависит от $Ca^{2+}$) |
| 5. Добавление к препарату рецепторов, инкубированному с фосфолипазой А или С, обработанных ультразвуком суммарных липидов семенников | Восстановление ~на 50% |
| 6. Алкилирование (N-этилмалеимид, иодацетамид) | Отсутствие влияния |
| 7. Окисление (дитиобис-2-динитробензоат) | То же |
| 8. Восстановление (дитиотрейтол) | Полное подавление |
| 9. Прогревание (60° С) в течение 10 мин [17] | Уменьшение |
| 10. ЭДТА | » |
| 11. Этанол (40%) [37] | Полное подавление |
| 12. Тритон Х-100 [25] | Уменьшение |

[1] Гомогенат и(или) мембранную фракцию обрабатывали соответствующим агентом, после чего агент удаляли отмывкой и измеряли специфический захват меченого гормона рецепторами в опытном и контрольном препаратах.

*Таблица 5*

**Влияние различных воздействий на специфическое связывание $^{125}$I-ФСГ человека**

| Воздействие | Влияние |
|---|---|
| 1. Инкубация с 10 000-кратным избытком немеченого гормона (2 ч, 37° С) | Гормон не высвобождается из комплексов с рецептором |
| 2. Инкубация с АТФ или ГТФ ($5 \times 10^{-3}$ М) | Освобождение гормона из комплексов с рецептором увеличивается |
| 3. Увеличение ионной силы до 1,0 с помощью NaCl | Гормон высвобождается из комплексов с рецептором |
| 4. Снижение pH до 4,5 | Гормон высвобождается из комплексов с рецептором, но 40% высвободившегося гормона вновь захватывается необработанными рецепторами |
| 5. Снижение pH до 2,6 | Гормон высвобождается из комплексов с рецептором; повторного захвата гормона необработанными рецепторами не происходит |
| 6. Этанол | Частичное высвобождение гормона из комплексов с рецепторами |

*Таблица 6*

**Свойства рецепторов ФСГ очищенных мембран семенных канальцев**

| Характеристика | Примечания |
|---|---|
| $K_d$ по данным скэтчардовского анализа [52] | $5{,}5\cdot10^{-11}$ М (высокое сродство); $3{,}85\times10^{-9}$ М (низкое сродство) |
| Количество связывающих участков [52] | $9\cdot10^{-14}$ молей на 1 мг белка (высокая емкость); $8{,}5\cdot10^{-14}$ молей на 1 мг белка (низкая емкость) |
| Зависимость захвата от pH | Максимум захвата при pH 7,5 |
| Кинетика захвата | Максимум захвата через 3 ч инкубации с гомогенатом; максимум захвата через 1 ч инкубации с мембранами семенных канальцев |
| Удаление сиаловой кислоты из ФСГ | Увеличение захвата |
| Алкилирование ФСГ N-этилмалеимидом или иодацетамидом | Не влияет на захват |
| Восстановление ФСГ дитиотрейтолом | Захват полностью подавляется |

III и IV, A. В описываемых ниже опытах перед добавлением $^{125}$I-ФСГ человека рецепторные фракции соответствующим образом отмывались от избытка химического реагента или фермента. Для удобства полученные результаты суммированы в табл. 4, 5 и 6.

Алкилирование SH-групп гомогената семенных канальцев и мембранных фракций с помощью N-этилмалеимида (N-ЭМ) или иодацетамида (ИАА), а также окисление дитиобис-2-*d*-нитробензоатом не влияло на специфический захват $^{125}$I-ФСГ человека. Но этот захват значительно (на 80%) подавлялся обработкой рецепторных препаратов дитиотрейтолом (ДТТ). Алкилирование $^{125}$I-ФСГ человека с помощью N-ЭМ или ИАА не изменяло его специфического захвата рецепторами. Восстановление $^{125}$I-ФСГ человека избытком ДТТ приводило к исчезновению специфического связывания. Следовательно, для специфического связывания гормона важны интактные дисульфидные связи, а не свободные SH-группы. Даже 10 000-кратный избыток немеченого гормона не мог вытеснить иодированный ФСГ человека из комплексов с рецепторами при инкубации в течение 16 ч при 4° С, но высвобождение ФСГ из комплексов с рецепторами увеличивалось в присутствии АТФ или ГТФ. Гормон-рецепторные комплексы диссоциировали при возрастании ионной силы в присутствии NaCl (0,1—1,0 М) или снижении pH до 4,5. Значительное количество высвобожденного при этом гормона (40%) может вновь захватываться свежей порцией рецепторов. Отсутствие полного восстановления захвата гормона, возможно, свидетельствует о том, что после его связывания с рецептором он метаболизируется.

Данный результат можно объяснить также наличием в суспензии, содержащей рецепторы, неизвестного фактора, например растворимой протеазы.

Гормон, высвободившийся из комплексов с рецепторами после инкубации при pH 2,6, совсем не связывается новой порцией рецепторов. Это наблюдение соответствует ранее полученным данным о том, что при такой величине pH молекулы ФСГ быстро диссоциируют на субъединицы [21] и что сами по себе субъединицы ФСГ не обладают выраженной способностью взаимодействовать с рецепторами [19, 20]. $^{125}$I-ФСГ человека, специфически связанный с рецепторами семенных канальцев, выделялся из комплексов после восстановления с помощью ДТТ. Выделенный гормон не обладал способностью вновь специфически связываться свежей порцией рецепторов, что свидетельствует о значительных конформационных перестройках в молекуле ФСГ, возникающих, как можно думать, за счет разрыва дисульфидных мостиков. Инкубация рецепторов семенных канальцев с различными протеолитическими ферментами, такими, как трипсин, химотрипсин, проназа или коллагеназы, приводило к подавлению специфического связывания $^{125}$I-ФСГ при последующем добавлении гормона. Обработка РНКазой или ДНКазой не влияла на специфический захват $^{125}$I-ФСГ человека, в то время как инкубация с нейраминидазой приводила приблизительно к двукратному увеличению специфического захвата гормона. Сходные во многих отношениях результаты были получены в исследованиях по изучению захвата ХГ человека и ЛГ в гомогенатах семенников крыс [35, 51].

Инкубация препаратов рецепторов семенных канальцев с фосфолипазой А или С перед определением связывания ФСГ человека приводила к значительному подавлению специфического захвата гормона. Этот эффект, по-видимому, зависит от присутствия $Ca^{2+}$ и сопровождается гидролизом фосфолипидов. Интересно, что специфическое связывание ФСГ человека лишенным липидов осадком рецепторов частично восстанавливается (до 57%) при добавлении обработанных ультразвуком мицеллярных суммарных липидов семенников. Эти результаты показывают, что, как и в случае других гормонов [34], во взаимодействии ФСГ с рецепторами важную роль играют связанные с мембранами липиды.

## В. Солюбилизация рецепторов ФСГ

Под термином *рецептор* мы понимаем мембранный компонент ткани-мишени, специфически связывающий соответствующий тропный гормон; в результате образования комплекса гормон — рецептор запускается цепь реакций, завершающаяся проявлением гормонального действия. С точки зрения такого определения

понятие *«солюбилизированные рецепторы»* является не совсем корректным, поскольку рецепторы, очевидно, могут инициировать конечные гормональные эффекты лишь в том случае, если входят в состав мембран, где они находятся, по всей видимости, в высокоструктурированном окружении [34]. Поэтому для обозначения солюбилизированных мембранных компонентов, взаимодействие которых с ФСГ может быть показано с помощью нескольких критериев, мы будем использовать термин *фактор*. Вполне возможно, что взаимодействие ФСГ или любого другого белкового гормона с солюбилизированным рецептором существенно отличается от специфического взаимодействия с тем же самым компонентом, находящимся в составе мембраны. Тем не менее выявление и характеристика любого фактора, который принимает участие в специфическом связывании гормона рецепторами, ассоциированными с мембранами, с точки зрения предполагаемого механизма действия гормонов представляет большой интерес.

Много усилий было затрачено на солюбилизацию рецепторов ЛГ и ХГ человека из семенников и яичников [26]. Как и в случае рецепторов многих белковых или пептидных гормонов, добиться солюбилизации рецепторов гонадотропинов чаще всего удавалось с помощью неионных детергентов типа тритона Х-100 или луброла РХ. Эти детергенты, как было доказано, эффективно солюбилизируют белки, ассоциированные с мембранами. В табл. 7 сведены результаты экспериментов по изучению влияния различных солюбилизирующих агентов на специфическое связывание $^{125}$I-ФСГ человека рецепторами семенников крыс.

*Таблица 7*

**Влияние обработки гомогенатов интактных семенников различными реагентами на связывание $^{125}$I-ФСГ[1] человека**

| Воздействие | Уменьшение связывания в гомогенате после его обработки[2], % от необработанного контроля |
|---|---|
| Замораживание и оттаивание (5 раз) | 25—30±2 |
| Луброл РХ, 0,12% | 70±2 |
| Луброл WX, 0,09% | 75,4±3 |
| Тритон Х-100, 0,4% | 73±2 |
| Этанол, 40% | 80±2 |

[1] Гомогенат целых семенников (45 мг на пробу) обрабатывали 1 мл буфера с детергентом в течение 1 ч при 4° С (за исключением экспериментов с замораживанием и оттаиванием). Осадок промывали и повторно центрифугировали. Полученный при этом осадок использовали в экспериментах по определению связывания в присутствии и в отсутствие избытка немеченого гормона [25].

[2] По результатам уменьшения специфического связывания $^{125}$I-ФСГ.

Учитывая теоретические предпосылки [36], мы попытались найти способы солюбилизировать рецепторы ФСГ (факторы), не прибегая к помощи детергентов. Особое внимание было уделено изучению возможности использовать для этой цели этанол. Мы нашли, что обработка гомогенатов семенников 30%-ным (по объему) этанолом в 0,01 М фосфатном буфере при 37° С вызывает значительное уменьшение специфического связывания $^{125}$I-ФСГ человека [37]. Эта потеря связывающей активности зависит от температуры и достигает максимума при 37° С. Вообще говоря, к аналогичному эффекту должно приводить и простое удаление из клеточных мембран липидов при экстракции этанолом, но пока мы не можем точно сказать, какова химическая природа «фактора». Обратная картина наблюдается в случае связывания печеночными и жировыми клетками крыс инсулина: здесь экстракция мембран органическими растворителями (этанолом или эфиром) приводит к увеличению связывания гормона с обработанными мембранами [38, 39]. До тех пор пока связывание гормона не будет выявлено в растворимой надосадочной фракции, исчезновение связывающей активности в препаратах осадков нельзя однозначно объяснить солюбилизацией существенного для связывания фактора. Было сделано несколько попыток создать метод определения специфического фактора связывания ФСГ в надосадочной фракции, содержащей этанол. В случае ХГ человека и ЛГ эта цель была достигнута избирательной преципитацией комплексов гормона с растворимым рецептором с помощью полиэтиленгликоля [40]; в качестве белка-носителя использовали γ-глобулин. Свободный гормон при этом остается в надосадочной жидкости, а связанный осаждается центрифугированием, после чего в осадке измеряют радиоактивность. К сожалению, в применении к $^{125}$I-ФСГ человека этот метод в наших опытах был менее эффективен, чем для других иодированных гликопротеидных гормонов.

В отличие от ситуации, имеющей место в случае ХГ или ЛГ, в наших экспериментах растворимость $^{125}$I-ФСГ человека в полиэтиленгликоле (карбовакс 400, 47% по объему) увеличивалась в присутствии факторов, выделенных из семенников при спиртовой экстракции [37]. Другое объяснение полученного факта заключается в том, что в нашей системе растворимый в этаноле фактор (РЭФ) уменьшал преципитацию $^{125}$I-ФСГ человека полиэтиленгликолем (ПЭГ). Несмотря на то что для данного явления (постепенного уменьшения количества осаждаемой радиоактивной метки по мере увеличения в пробе концентрации РЭФ) характерна чрезвычайно высокая чувствительность к малейшим изменениям в экспериментальных условиях, оно было использовано для разработки метода определения рецептора (фактора) [37]. Иными словами, в качестве показателя взаимодействия между ФСГ и РЭФ была использована растворимость ФСГ в ПЭГ.

Наличие взаимодействия между РЭФ и ФСГ выявлялось и двумя другими методами. Во-первых, при нанесении препарата РЭФ на колонку с сефарозой 4 В или сефадексом G-25, предварительно уравновешенную буфером с $^{125}$I-ФСГ человека до постоянной концентрации радиоактивности в элюате, наблюдалось увеличение выхода радиоактивного гормона с колонки. Это указывает на взаимодействие РЭФ с ФСГ. Сам этанол не оказывал подобного действия. Кроме того, если колонку уравновешивали $^{125}$I-бычьим сывороточным альбумином, то РЭФ семенников не вызывал концентрирования меченого альбумина [37].

Во-вторых, взаимодействие между ФСГ и РЭФ выявляли с помощью кругового дихроизма (КД): и отдельные детали, и общий вид спектров КД смесей ФСГ человека с РЭФ значительно отличались от спектров КД при раздельном анализе РЭФ и ФСГ [37]. Эксперименты с гель-фильтрацией неочищенных препаратов РЭФ на колонках с сефадексом G-100 показали, что ФСГ взаимодействует с компонентами, имеющими средние коэффициенты распределения 0,19 (приблизительный мол. вес 67000) и 0,29 (приблизительный мол. вес 22500). Пока еще не известно, какова химическая природа этих активных компонентов; возможно, это белки или комплексы белков с небелковыми составляющими, например липидами. Представляет определенный интерес тот факт, что в условиях, при которых, как было ранее показано, происходит полное подавление захвата гормона, этанолом разрушалась лишь небольшая доля (около 30%) сформированных комплексов ФСГ с рецепторами семенников. Это позволяет предположить, что РЭФ может являться посредником взаимодействия гормона с рецептором, но не требуется для сохранения уже сформированного комплекса.

Мы предприняли серию экспериментов с целью выяснить возможное биологическое значение взаимодействия ФСГ человека с РЭФ. Недавние исследования показали, что, судя по результатам опытов с ПЭГ, спиртовые экстракты таких тканей неполовой сферы, как печеночная, почечная и сердечная (но не мышечная), также взаимодействуют с $^{125}$I-ФСГ человека. В настоящее время значение этого феномена неясно. Возможно, что взаимодействие $^{125}$I-ФСГ человека с РЭФ семенников крыс, хотя и является реальным и воспроизводимым процессом, но отражает неспецифическое взаимодействие ФСГ с растворимым в этаноле широко распространенным тканевым фактором и, следовательно, не имеет существенного значения для специфического взаимодействия ФСГ с рецепторами семенных канальцев in vivo. Но вместе с тем наличие РЭФ в ткани гонад и его возможное участие в связывании ФСГ и ЛГ специфическими тканевыми рецепторами может свидетельствовать о физиологическом значении РЭФ. Не исключено, что подобный фактор (хотя он присутствует не только в ткани гонад) может способствовать концентрированию ФСГ (или

ЛГ) на специфических рецепторах или вблизи от них до тех пор, пока под действием рецептора не начнется проявление гормонального эффекта. Такое предположение не противоречит «квантовой» теории классической фармакологии, распространенной Родбардом [41] на взаимодействие белковых гормонов с рецепторами. Совершенно очевидно, что для выяснения истинной природы компонента, который мы здесь обозначили как фактор семенников крыс, связывающий ФСГ, необходимы дальнейшие исследования.

## Благодарность

Данная работа финансировалась фондом HD-08228 (LER) и представляет собой публикацию № 1205 отдела фундаментальных исследований здравоохранения Университета Эмори. Нам приятно выразить признательность миссис Розмари Рэмсей, мисс Элоизе Картер, миссис Ненси Ших и мисс Юдифь Кейн, оказавшим квалифицированную помощь на различных этапах выполнения данной работы.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hansson V., French F. S., Weddington S., Nayfeh S., Ritzen E. M.*, in: Current Topics in Molecular Endocrinology, Vol. 1, Hormone Binding and Activation in the Testis (M. L. Dufau and A. R. Means, eds.), Plenum Press, New York, 1974, p. 287.
2. *Means A. R., Huckins C.*, in: Current Topics in Molecular Endocrinology, Vol. 1, Hormone Binding and Activation in the Testis (M. L. Dufau and A. R. Means, eds.), Plenum Press, New York, 1974, p. 145.
3. *Zeleznik A. J., Midgley A. R., Reichert L. E., Jr.*, Endocrinology, *95*, 818 (1974).
4. *Hunter W. M., Greenwood F. C.*, Nature, *194*, 495 (1962).
5. *Greenwood F. C., Hunter W. M., Glover J. S.*, Biochem. J., *89*, 114 (1963).
6. *Leidenberger F. L., Reichert L. E.*, Jr., Endocrinology, *91*, 901—909 (1972).
7. *Reichert L. E., Jr., Leidenberger F., Trowbridge C. G.*, Recent Prog. Horm. Res, *29*, 497—526 (1973).
8. *Reichert L. E., Jr., Lawson G. M., Jr., Leidenberger F. L., Trowbridge C. G.*, Endocrinology, *93*, 938—946 (1973).
9. *Leidenberger F., Reichert L. E.*, Jr., Endocrinology, *91*, 135 (1972).
10. *Butt W. R.*, Acta Endocrinol. [Suppl]. (Kloh.), *142*, 13 (1969).
11. *Miyachi Y., Vaitukaitis J. L., Nieschlag E., Lipsett M. B.*, J. Clin. Endocrinol., *34*, 23 (1972).
12. *Miyachi Y., Chrambach A.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *46*, 1213 (1972).
13. *Vaitukaitis J. L., Sherins R., Ross G. T., Hickman J., Ashwell G.*, Endocrinology, *89*, 1356 (1971).
14. *Butt W. R.*, J. Endocrinol., *55*, 453 (1972).
15. *Bolton A. E., Hunter W. M.*, Biochem. J., *133*, 529 (1973).
16. *De La Llosa P., Marche P., Morgat J. L., De La Llosa-Hermier M. P.*, FEBS Lett., *45*, 162 (1974).
17. *Bhalla V. K., Reichert L. E.*, Jr., J. Biol. Chem., *249*, 43 (1974).
18. *Reichert L. E., Jr.*, in: Methods in Receptor Research (Methods in Molecular Biology Series) (M. Blecher, ed.), Marcel Dekker, New York, 1976.
19. *Reichert L. E., Jr., Bhalla V. K.*, Endocrinology, *94*, 483 (1974).

20. *Reichert L. E., Jr., Trowbridge C. G., Lawson G. L.*, J. Biol. Chem., *249*, 6472 (1974).
21. *Reichert L. E., Jr., Ramsey R. B.*, J. Biol. Chem., *250*, 3034 (1975).
22. *Means A. R., MacDougall E., Solderling T. R., Cordin J. D.*, J. Biol. Chem., *249*, 1231 (1974).
23. *Means A. R.*, Life Sci., *15*, 371 (1974).
24. *Means A. R., Vaitukaitis J. L.*, Endocrinology, *90*, 39 (1972).
25. *Bhalla V. K., Reichert L. E., Jr.*, in: Current Topics in Molecular Endocrinology, Vol. 1, Hormone Binding and Activation in Testes (M. L. Dufau and A. R. Means, eds.), Plenum Press, New York, 1974, p. 201.
26. *Dufau M. L., Means A. R.* (eds.), Current Topics in Molecular Endocrinology, Vol. 1, Hormone Binding and Activation in Testes, Plenum Press, New York, 1974.
27. *Mancini R. E., Costra A., Seiguer A. C.*, Histochem. Cytochem., *15*, 516 (1967).
28. *Kuehl F. A., Jr., Patanelli D. J., Tarnoff J., Humes J. L.*, Biol. Reprod., *2*, 154 (1970).
29. *Christensen A. K., Mason N. R.*, Endocrinology, *76*, 646 (1965).
30. *Rommerts F. F. G., van Doorn L. G., Galjaard H., Cook B. A., van der Molen H. J.*, J. Histochem. Cytochem., *21*, 572 (1973).
31. *Midgley A. R., Jr.*, Adv. Exp. Med. Biol., *36*, 365 (1973).
32. *Goldenberg R. E., Recter E. O., Vaitukaitis J. L., Ross G. T.*, Endocrinology, *92*, 1565 (1973).
33. *Żeleznik A. J., Desjardin C., Midgley A. R., Jr., Reichert L. E., Jr.*, Endocrinology (submitted).
34. *Cuatrecasas P.*, Annu. Rev. Biochem., 43, 169 (1974).
35. *Bahl O. P., Marz L., Moyle W. R.*, in: Current Topics in Molecular Endocrinology, Vol. 1, Hormone Binding and Activation in the Testes (M. L. Dufau and Means A. R., eds.), Plenum Press, New York, 1974, p. 124.
36. *Makino S., Reynolds J. A., Tanford C.* J., Biol. Chem., *248*, 4926 (1973).
37. *Bhalla V. K., Reichert L. E., Jr.*, J. Biol. Chem., *249*, 7996 (1974).
38. *Cuatrecasas P.*, Fed. Proc., *32*, 1839 (1973).
39. *Cuatrecasas P.*, J. Biol. Chem., *246*, 6532 (1971).
40. *Dufau M. L., Charreau E. H., Catt K. J.*, J. Biol. Chem., *248*, 6973 (1973).
41. *Rodbard D.*, in: Current Topics in Molecular Endocrinology, Vol. 1, Hormone Binding and Activation in the Testes (M. L. Dufau and A. R. Means, eds.), Plenum Press, New York, 1974, p. 79.
42. *Greep R. O., van Dyke H. B., Chow B. F.*, Endocrinology, *30*, 635 (1942).
43. *Lostroh A. J., Johnson R. E.*, Endocrinology, *79*, 991 (1966).
44. *Neville D. M., Jr.*, J. Biophys. Biochem. Cytol., *8*, 413 (1960).
45. *Pohl S. L., Birnbaumer L., Rodbell M.*, J. Biol. Chem., *246*, 1849 (1971).
46. *Kornfeld R., Siemers C.*, J. Biol. Chem., *249*, 1295 (1974).
47. *McKerns K. W.*, Biochemistry, *12*, 5206 (1973).
48. *Braun T., Sepenswol S.*, Endocrinology, *94*, 1028 (1974).
49. *Steinberger A., Thanki K. H., Siegal B.*, in: Carrent Topics in Molecular Endocrinology, Vol. 1, Hormone Binding and Activation in the Testes (M. L. Dufau and A. R. Means, eds.), Plenum Press, New York, 1974, p. 171.
50. *Ketelslegers J. M., Catt K. J.*, J. Clin. Endo. Metab., *39*, 1159 (1974).
51. *Tsuruhara T., van Hall E. V., Dufau M. L., Catt K. J.*, Endocrinology, *91*, 463 (1972).
52. *Abou-Issa H., Reichert L. E., Jr.*, J. Biol. Chem., *251*, 3326 (1976).

## Глава 8

# ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА РЕЦЕПТОРОВ ГОНАДОТРОПИНОВ

*К. КЭТТ И М. ДЮФО*

Section on Hormonal Regulation
Reproduction Research Branch
National Institute of Child Health and Human Development
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland

## I. ВВЕДЕНИЕ

Существование в семенниках и яичниках рецепторов гонадотропинов с высокой специфичностью и сродством к лютеинизирующему гормону (ЛГ) и к фолликулостимулирующему гормону (ФСГ) было установлено с помощью методов радиоавтографии и определения связывания in vitro с применением гонадотропинов, меченных радиоактивным иодом и тритием. В исследованиях по изучению локализации и связывающих свойств рецепторов ЛГ часто использовали меченый хорионический гонадотропин (ХГ) человека, поскольку этот плацентарный гонадотропин более доступен в высокоочищенной форме, более стабилен и более активен после введения в него радиоактивного иода, чем ЛГ. Биологические свойства ХГ, по-видимому, почти идентичны биологическим свойствам ЛГ, и, кроме того, оба гликопротеидных гормона связываются и в семенниках, и в яичниках одними и теми же рецепторными участками. Поэтому в данной главе рецепторные участки, идентифицированные с помощью связывания меченого ХГ человека, будут обозначаться как рецепторы ЛГ или рецепторы ЛГ/ХГ. Впервые наличие рецепторов гонадотропинов в семенниках и яичниках крыс было показано радиоизотопными методами с введением иодированных ЛГ или ХГ человека in vivo и последующей радиоавтографией. В этих экспериментах меченый гормон локализовался, как и ожидалось, на клетках-мишенях — клетках Лейдига семенников и клетках желтых тел яичников [1—3]. Детальный радиоавтографический анализ, примененный в более поздних исследованиях, показал, что рецепторы ЛГ в яичниках крыс присутствуют в интерстициальной ткани и в клетках оболочки развивающегося фолликула; в момент формирования полости фолликула рецепторы ЛГ начинают появляться также в гранулезных клетках [4]. Кроме того, было обнаружено, что гранулезные клетки, выделенные из крупных фолли-

кулов яичников свиней, связывают меченый ХГ человека значительно интенсивнее, чем гранулезные клетки из мелких фолликулов [5].

В отличие от яичников в семенниках распространение рецепторов ЛГ/ХГ ограничено одним типом клеток: рецепторы этих гормонов обнаруживаются лишь в клетках Лейдига. У взрослых крыс связывание меченого ХГ человека семенными канальцами после их тщательного отделения от интерстициальных клеток обнаружить не удается. Интересно отметить, что появление рецепторов ЛГ в семенниках плода происходит на очень ранней стадии эмбрионального развития. Так, в семенниках плода кролика специфические участки связывания гонадотропинов ЛГ/ХГ появляются примерно на 18-й день развития одновременно с морфологическим и биохимическим созреванием клеток Лейдига [6].

Подобное морфологическое доказательство существования рецепторных участков для гонадотропинов в гонадах было дополнено большим количеством данных, полученных в экспериментах in vitro, которые показали, что специфические участки связывания гормона имеются в срезах, в суспензиях клеток и в гомогенатах семенников и яичников. Использование этих методов позволило выявить наличие рецепторов ЛГ в семенниках крысы, мыши, кролика, свиньи, барана и быка, а также в желтом теле яичников крысы, мыши, свиньи, коровы, макака-резуса и человека [7—27]. Обычно в экспериментах по определению связывания in vitro использовали гомогенаты целых гонад, что оказалось вполне подходящим приемом для предварительной характеристики рецепторных участков и для определения гормонов с помощью рецепторов. Для получения более гомогенных субклеточных фракций были использованы фрагментированные интерстициальные клетки и мембранные фракции из гомогенатов семенников и желтых тел. Структура семенников крыс такова, что позволяет эффективно отделять большие количества интактных и фрагментированных клеток Лейдига от семенных канальцев. Фракции частиц интерстициальных клеток, полученные таким образом, обогащены плазматическими мембранами и являются хорошим источником рецепторов ЛГ для проведения экспериментов по связыванию рецепторами гормона и солюбилизации рецепторов [8, 12, 13]. Хотя относительное содержание клеток Лейдига в семенниках некоторых других видов животных, особенно в семенниках свиньи, значительно превышает их содержание в семенниках крысы, возможность фракционирования гонад крысы с получением относительно богатых мембранами фракций фрагментированных клеток Лейдига делает этот объект особенно удобным для исследования рецепторов ЛГ. Точно так же, несмотря на то что желтые тела яичников скота, например коровы и свиньи, благодаря своим размерам и гомогенности обладают определенными преимуществами, значительное число работ было выполнено на яичниках крысы; особенно

часто использовались сильно лютеинизированные гонады неполовозрелых крыс, получавших гонадотропин сыворотки крови жеребой кобылы и ХГ человека.

При изучении связывания меченного тритием или, чаще, радиоактивным иодом ФСГ человека в семенниках и яичниках были обнаружены рецепторные участки для ФСГ [18, 28—30]. В семенниках половозрелых крыс рецепторы ФСГ находятся только в семенных канальцах; они присутствуют в клетках Сертоли и, возможно, в клетках других типов. В яичниках рецепторы ФСГ локализуются в гранулезных клетках [4], которые по своей функции поддержания развития половых клеток аналогичны клеткам Сертоли. У крыс рецепторы ФСГ были обнаружены в гранулезных клетках мелких фолликулов перед появлением рецепторов ЛГ. Введение животным ФСГ сопровождалось индукцией в гранулезных клетках рецепторов ЛГ [31].

## II. СВОЙСТВА РЕЦЕПТОРОВ ГОНАДОТРОПИНОВ

В целом связывающим участкам, обнаруживаемым в экспериментах с меченными радиоактивным иодом гонадотропинами, присущи многие из тех свойств, которыми должны обладать важные в биологическом плане рецепторные участки для активных гормональных лигандов. Сюда относятся высокое сродство и структурная специфичность для лиганда, насыщаемость и ограниченная связывающая емкость, а также способность этих участков к сопряжению процесса связывания и характерного для клеток-мишеней ответа. Кроме того, было показано, что концентрация рецепторных участков для гонадотропинов в тканях-мишенях изменяется в соответствии с функциональным состоянием гонад.

### А. Рецепторы ЛГ/ХГ

Локализация рецепторов ЛГ в плазматических мембранах клеток Лейдига из семенников и клеток желтого тела из яичников была установлена с помощью центрифугирования в градиенте плотности с последующим электронно-микроскопическим анализом и изучением маркерных ферментов [12, 14, 24, 27, 32, 33], а также с помощью электронно-микроскопической радиоавтографии [34]. К другим доказательствам поверхностной локализации рецепторов ЛГ относится сохранение биологической активности ЛГ, прикрепленного к агарозе [35], возможность отмывания связанного семенниками гонадотропина при низких значениях pH [36] и эффективность действия трипсина на связывание меченого ХГ человека интактными клетками Лейдига [32]. Ассоциация ЛГ или ХГ с рецепторными участками сильно зависит от температуры; при 37° С процесс взаимодействия происходит быстрее, чем при более низкой температуре. Тем не менее многие исследования по

изучению связывания меченых ЛГ и ХГ проводились при 20—24° С, чтобы свести к минимуму деградацию гормона и (или) рецепторов в процессе реакции связывания. Скорость взаимодействия между рецепторными участками и гормоном зависит также от их концентраций, подчиняясь, как и ожидали, кинетике реакций второго порядка. Если же имеется избыток гормона, то кинетика взаимодействия подчиняется уравнению реакций псевдоперво-

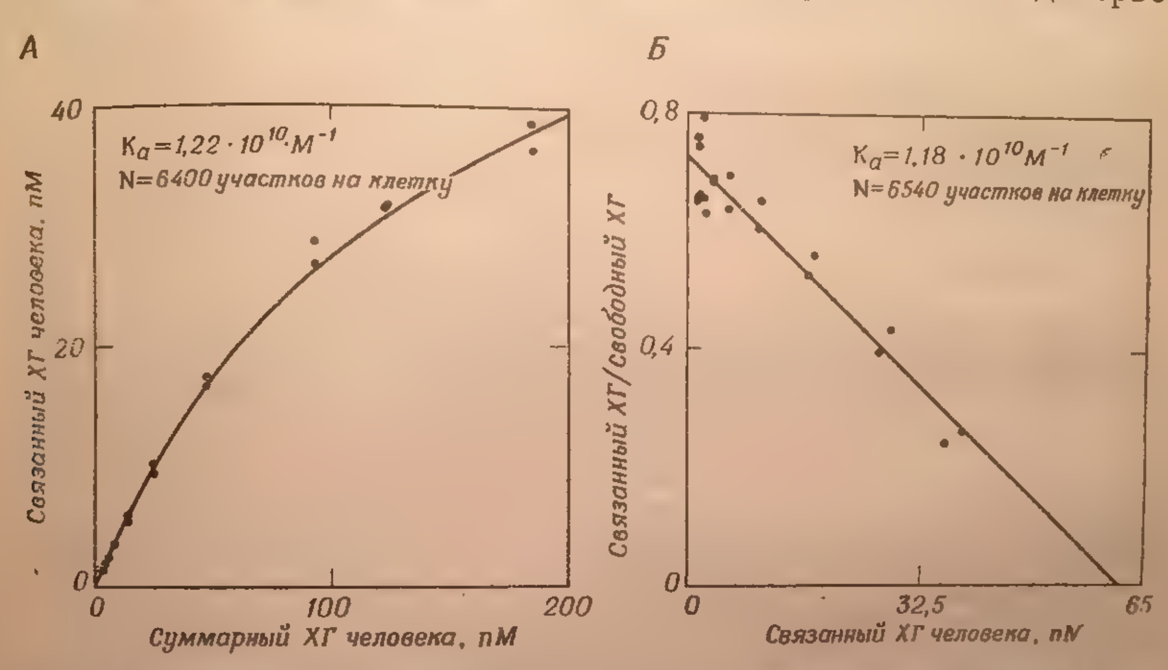



**Рис. 1.** *А.* Связывание ХГ человека диспергированными клетками Лейдига в присутствии возрастающих концентраций ХГ человека при постоянном соотношении немеченого и меченого ХГ. Кривая насыщения для специфического связывания ХГ человека была получена с помощью машинной обработки результатов по определению общего связывания радиоактивности и неспецифического связывания, измеренного в присутствии избытка немеченого ХГ человека. *Б.* Скэтчардовский график результатов связывания, полученных при инкубации интерстициальных клеток семенников крыс с $^{125}$I-ХГ человека в течение 2 ч при 34° С.

го порядка [37]. Было установлено, что связывающие характеристики рецепторов гонадотропинов в изолированных интактных клетках Лейдига идентичны свойствам рецепторов в гомогенатах семенников и в препаратах мембран интерстициальных клеток. Измерения количества связывающих участков для меченого ХГ человека в клетках Лейдига дали величину около 6000 рецепторов на клетку (рис. 1). Константа равновесия для связывания рецепторов ЛГ равна $4 \cdot 10^{10}$ М$^{-1}$. Постоянно получаемые в скэтчардовских координатах прямые линии, а также прямые с наклоном 1,0 в координатах Хилла свидетельствуют о наличии лишь одного класса связывающих участков, не взаимодействующих между собой. Скорость диссоциации комплексов гонадотропин — рецептор весьма невелика, особенно при низких температурах. Период полужизни гормон-рецепторных комплексов при 24° С

составляет около 24 ч, а при 4° С реакция диссоциации протекает еще медленнее. Это свойство гонадотропиновых рецепторных участков оказалось очень ценным для проведения экспериментов по солюбилизации и изучению физических свойств рецепторов, давая возможность выполнять относительно длительные процедуры фракционирования, включая гель-фильтрацию и центрифугирование растворенных рецепторов в градиенте плотности. Использование рецепторов ЛГ/ХГ для анализа связывания меченых лигандов с рецепторами и для структурных исследований связывающих свойств нативных и модифицированных гонадотропинов и их субъединиц описано в многочисленных публикациях [8—11, 17, 19, 21, 26, 38—40].

### Б. Рецепторы ФСГ

Изучению рецепторов ФСГ в яичниках было посвящено относительно немного работ, причем большинство из них относится к разряду физиологических, анализирующих изменения рецепторов ФСГ при различных функциональных состояниях [4] или при гормональной терапии [41]. Наиболее важным результатом подобного рода исследований явилось установление того факта, что в яичниках неполовозрелых крыс эстрогены оказывают стимулирующий эффект на рецепторы ФСГ гранулезных клеток [41]. В семенниках рецепторы ФСГ были обнаружены во фракциях плазматических мембран семенных канальцев [18]; основным местом локализации рецепторов ФСГ являются, вероятно, клетки Сертоли [42]. Если использовали гомогенаты семенников неполовозрелых крыс, облученных в эмбриональный период жизни, семенные канальцы которых состоят почти исключительно из клеток Сертоли, то связывание меченого ФСГ в таких гомогенатах почти не отличалось от связывания в семенниках нормальных неполовозрелых крыс [42]. Взаимодействие между ФСГ и его рецепторами семенников было исследовано как у неполовозрелых, так и у взрослых крыс [18, 28—30, 42]. Кинетические и равновесные параметры взаимодействия ФСГ с рецепторами в целом близки к аналогичным свойствам рецепторов ЛГ — одно важное различие состоит лишь в том, что величина константы ассоциации ($K_a$) для рецепторов ФСГ почти на порядок ниже соответствующей характеристики рецепторов ЛГ/ХГ. Кроме того, связывание меченого ФСГ рецепторными участками обычно значительно ниже, чем связывание ХГ человека, поскольку в процессе иодирования ФСГ по сравнению с ХГ подвергается относительно большей инактивации. В работах по связыванию ФСГ для получения меченого гормона следует использовать лактопероксидазный метод, позволяющий свести к минимуму повреждающее действие процедуры введения метки. Наиболее эффективным способом очистки гормона является группо-специфическая хроматография на конканавалине А,

присоединенном к сефарозе [30, 43]. Дополнительной очистки меченого ФСГ достигают аффинной хроматографией на колонках с рецепторами, выделенными из фракции частиц семенников; для элюирования избирательно связанного активного гормона используют нагревание или инкубацию при низких величинах pH [30]. Полученный таким способом меченый гормон обладает повышенной способностью связываться рецепторами ФСГ гомогенатов семенников: в присутствии избытка рецепторов может связаться до 50% общего количества добавленного гормона. Такая степень связывания существенна для исследований по очистке и количественной оценке солюбилизированных рецепторных участков ФСГ, поскольку использование для этих целей препаратов меченого ФСГ, который специфически связывается рецепторами фракций частиц лишь на несколько процентов, не может обеспечить получение удовлетворительных результатов.

### В. Солюбилизация рецепторов ФСГ

Наиболее эффективным способом солюбилизации рецепторов ФСГ оказалась обработка тритоном X-100 гомогенатов семенни-

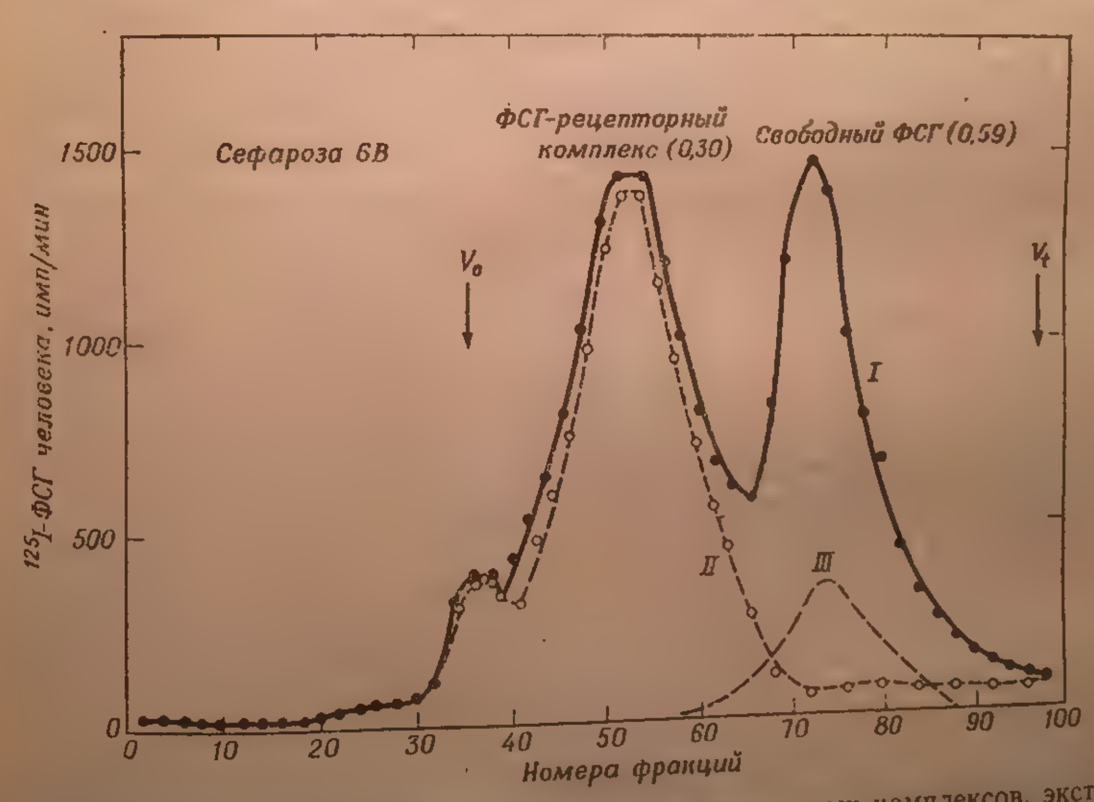



Рис. 2. Гель-фильтрация на сефарозе 6В гормон-рецепторных комплексов, экстрагированных тритоном X-100 из семенников крыс, которые предварительно метили $^{125}$I-ФСГ человека. Получены две зоны радиоактивности: зона, соответствующая свободному ФСГ (*I*, $K_{av}=0,59$), и зона, соответствующая гормон-рецепторному комплексу (*II*, $K_{av}=0,30$), компоненты которой в присутствии полиэтиленгликоля осаждаются на 98%. Гормон-рецепторные комплексы не обнаруживались, если предварительную инкубацию с $^{125}$I-ФСГ проводили в присутствии избытка ФСГ (*III*).

ков 21-дневных крыс, предварительно получавших $^{125}$I-ФСГ. Этим способом удавалось экстрагировать 20—40% рецепторов. Другие неионные детергенты, такие, как луброл PX и WX, были менее эффективны. Свойства рецепторов ФСГ семенников, солюбилизированных тритоном Х-100, были исследованы с помощью гель-фильтрации на сефарозе 6В (рис. 2). В отличие от солюбизированных рецепторов ЛГ (см. ниже) в процессе фракционирования рецепторов ФСГ наблюдалась значительная диссоциация гормон-рецепторных комплексов. Величина $K_{av}$ этих комплексов, по данным двух экспериментов, равнялась 0,30, что соответствует радиусу Стокса 6,5 нм. Близкая величина была получена in vitro и in vivo для растворимых комплексов рецепторов ЛГ с гормоном.

## III. СОПРЯЖЕНИЕ РЕЦЕПЦИИ ГОНАДОТРОПИНОВ И ОТВЕТОВ КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ НА ДЕЙСТВИЕ ГОРМОНОВ

В отношении рецепторов ряда пептидных гормонов было показано, что они сопряжены с аденилатциклазой клеточных мембран. Об этом свидетельствует наличие прямой корреляции между связыванием (т. е. занятостью рецепторных участков гормоном) и активацией ферментной системы in vitro [44—48]. Несмотря на то что обогащенные мембранами фракции частиц клеток Лейдига хорошо связывают гонадотропины и содержат аденилатциклазу,

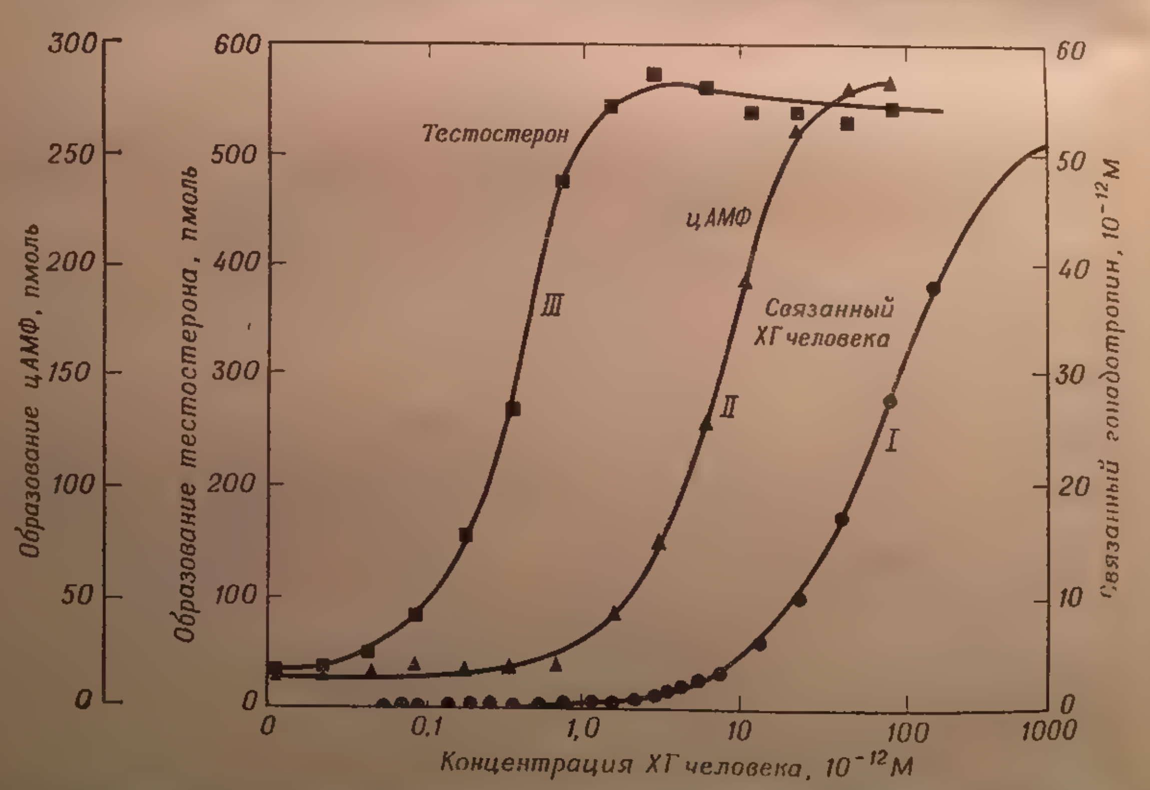



**Рис. 3.** Соотношение между связыванием гонадотропина (*I*, пМ), образованием цАМФ (*II*, пМ) и образованием тестостерона (*III*, пМ) при инкубации диспергированных с помощью коллагеназы интерстициальных клеток с ХГ человека в возрастающих концентрациях.

активность которой может быть значительно увеличена под действием фторида, гормональная чувствительность циклазы семенников в препаратах разрушенных клеток относительно низка. Интактная же ткань семенников и диспергированные с помощью коллагеназы интерстициальные клетки чрезвычайно чувствительны к стимулирующему действию ЛГ и ХГ человека; при инкубации с гонадотропинами in vitro в них образуется и выделяется значительное количество цАМФ [49—54]. В таких препаратах степень занятости рецепторных участков для ЛГ меченым гонадотропином коррелирует с последующим увеличением образования цАМФ (рис. 3). Этот факт, с одной стороны, показывает, что связывание гормона сопряжено с ответом клетки-мишени, а с другой — служит указанием на то, что бóльшая часть связывающих участков для ХГ человека является «активными» рецепторами (поскольку комплексирование этих участков с гормоном сопровождается стимуляцией образования цАМФ). Однако стимуляция стероидогенеза достигает максимума при занятости молекулами гормона всего лишь около 1% всех рецепторных участков [32, 53]. Остальные 99% рецепторных участков можно рассматривать как «запасные» рецепторы по аналогии с тем, что имеет место во многих чувствительных к лекарствам тканях. Второстепенная роль этих рецепторов отнюдь не означает, что они не несут функциональной нагрузки. Наличие большого избытка таких запасных рецепторов могло бы обеспечивать механизм увеличения чувствительности клетки-мишени к гормону в низкой концентрации за счет повышения вероятности связывания гормона с достаточным числом рецепторных участков; достижение такого связывания служит сигналом для начала ответа клетки-мишени на гормон. Однако длительное изучение взаимосвязи между концентрацией рецепторов и чувствительностью к гонадотропину в диспергированных с помощью коллагеназы клетках Лейдига не привело к выявлению достоверной зависимости между этими параметрами в пределах 10-кратного изменения содержания рецепторов в таких клеточных препаратах.

Хотя при высоком уровне занятости рецепторных участков гормоном между связыванием гормона и тканевым ответом наблюдается значительное несоответствие, начальная фаза связывания гонадотропина хорошо коррелирует с образованием тестостерона in vitro. Но эта фаза сопряжения связывания и ответа не сопровождается увеличением образования цАМФ. Такое расхождение между синтезом тестостерона и цАМФ в клетках Лейдига обнаружено в самых разнообразных экспериментальных условиях. Можно поэтому думать, что данный циклический нуклеотид не является посредником в действии гонадотропина на стероидогенез в клетках-мишенях. Конечно вполне допустимо, что главную роль играет не увеличение внутриклеточного содержания нуклеотида, а невыявляемое в эксперименте значительное повышение скорости

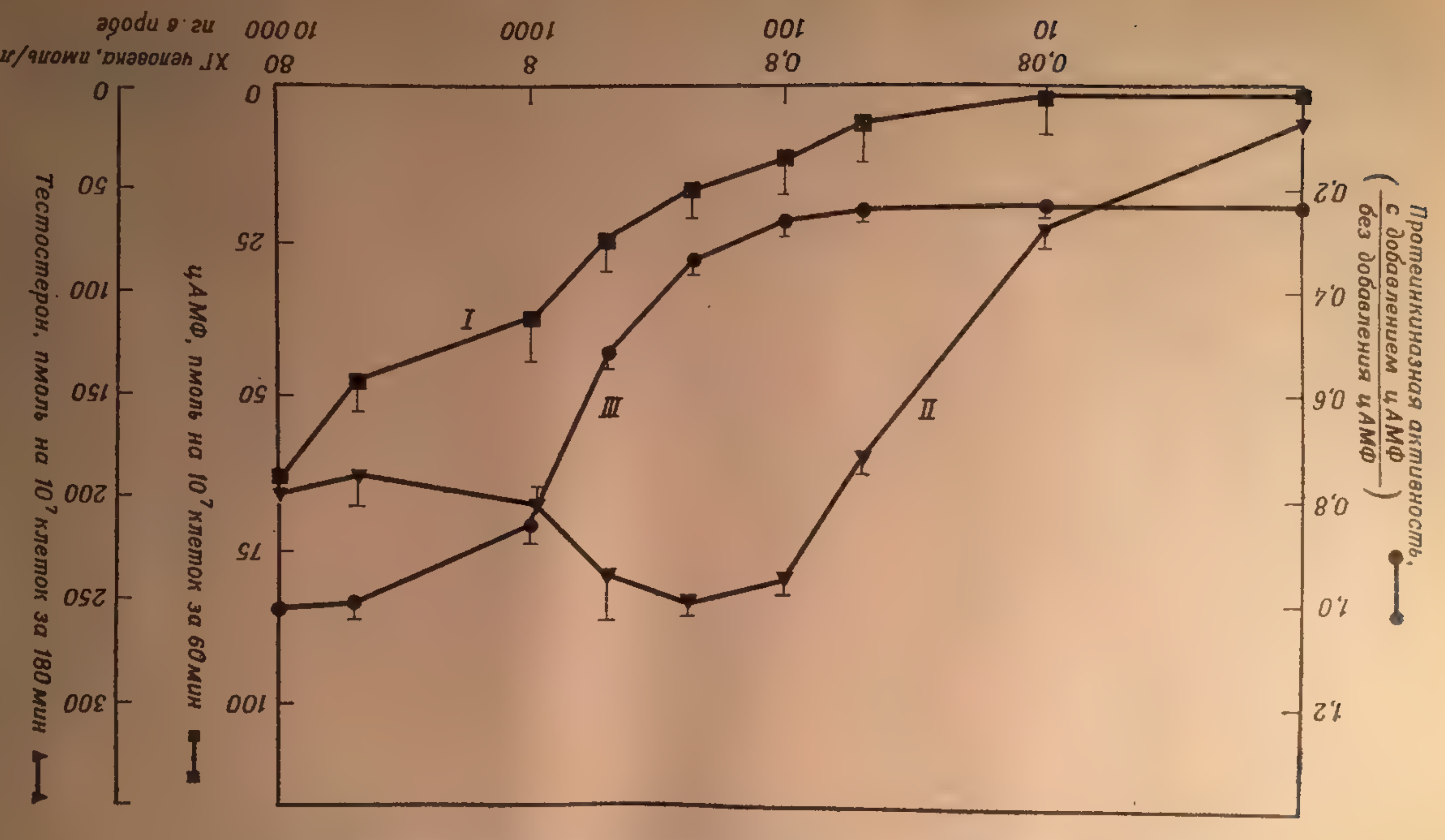



**Рис. 4.** Соотношение между образованием цАМФ (*I*), образованием тестостерона (*II*) и протеинкиназной активностью (*III*) при инкубации в течение 60 мин диспергированных с помощью коллагеназы интерстициальных клеток с ХГ человека в возрастающих концентрациях.

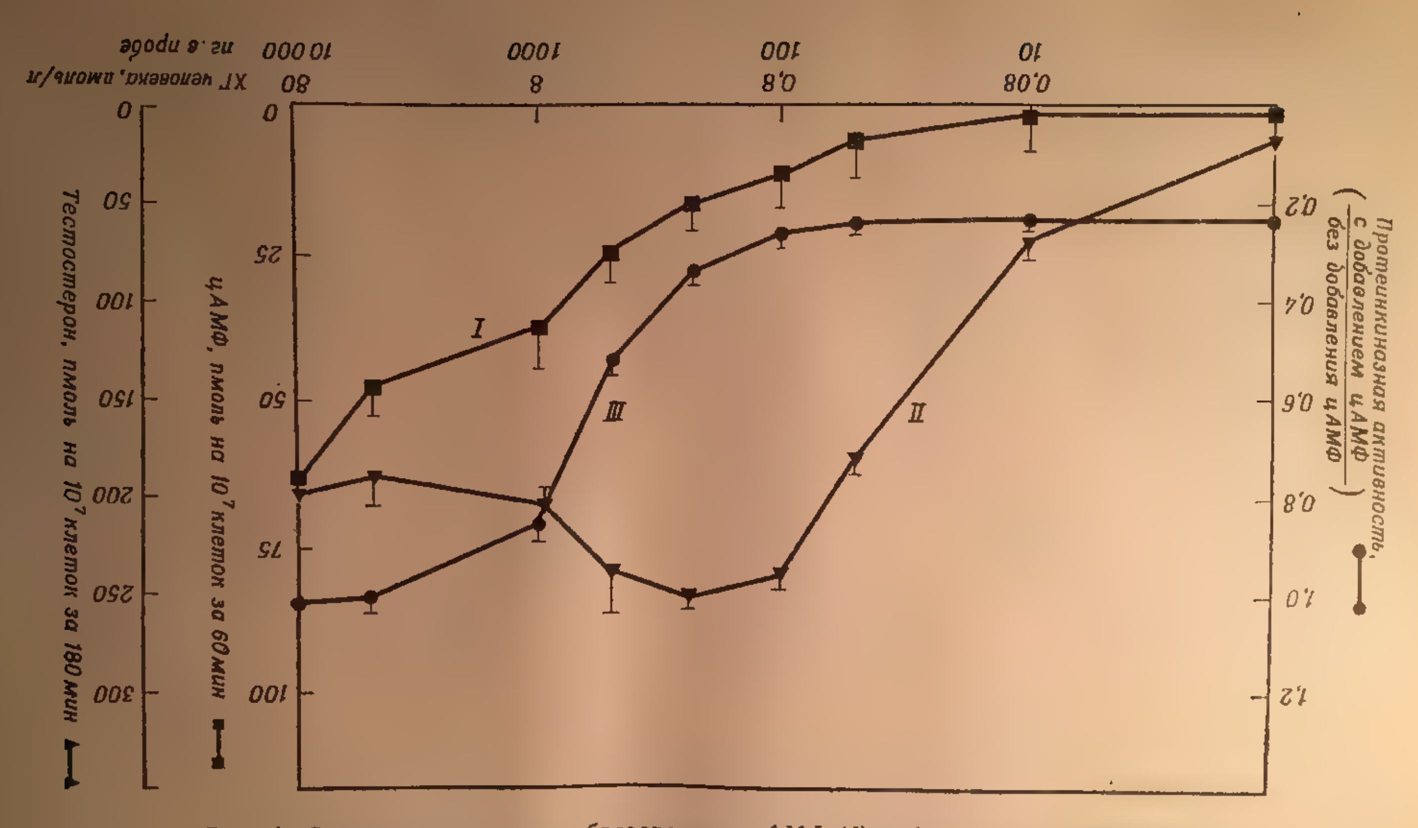



Рис. 4. Соотношение между образованием цАМФ (*I*), образованием тестостерона (*II*) и протеинкиназной активностью (*III*) при инкубации в течение 60 мин диспергированных с помощью коллагеназы интерстициальных клеток с ХГ человека в возрастающих концентрациях.

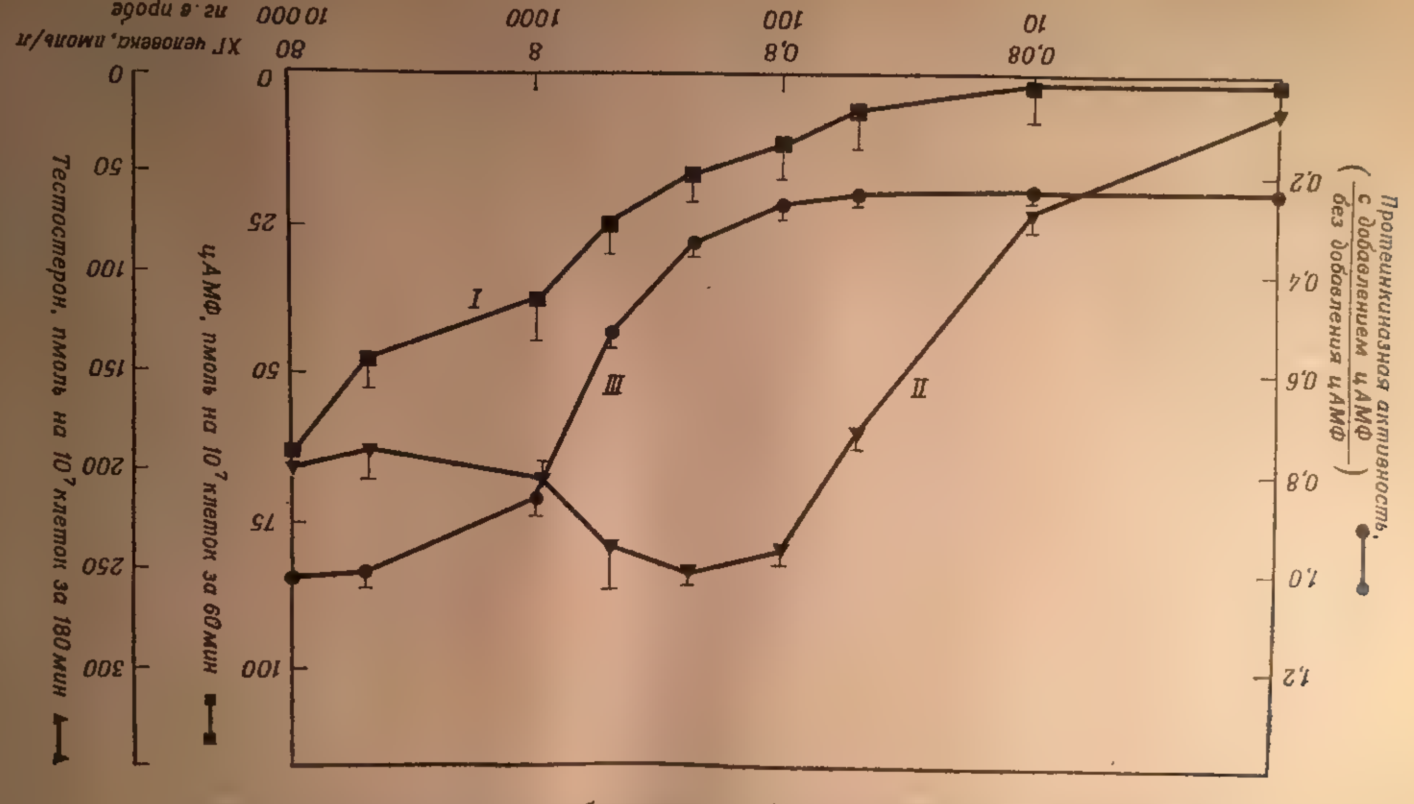



Рис. 4. Соотношение между образованием цАМФ (*I*), образованием тестостерона (*II*) и протеинкиназной активностью (*III*) при инкубации в течение 60 мин диспергированных с помощью коллагеназы интерстициальных клеток с ХГ человека в возрастающих концентрациях.

оборота цАМФ или небольшое увеличение его транслокации. Однако при одновременном измерении активности зависимой от цАМФ протеинкиназы и уровня цАМФ в процессе развития ответной реакции клеток Лейдига (образование андрогенов) на стимулирующее действие ХГ человека было обнаружено, что активация киназы и образование цАМФ происходят параллельно. Кроме того, при том уровне занятости рецепторных участков гормоном, при котором наблюдается максимальная стимуляция стероидогенеза in vitro, никакой активации протеинкиназы обнаружить не удается (рис. 4). Эти данные позволяют предполагать, что первоначальная фаза стимуляции синтеза тестостерона осуществляется с помощью локализованных в мембране механизмов, отличных от активации аденилатциклазы. В то же время основная часть специфических рецепторных участков для ЛГ/ХГ в клетках Лейдига связана с аденилатциклазой. Об этом свидетельствует параллелизм в стимуляции образования цАМФ и в степени занятости рецепторных участков гормоном, а также ассоциация растворимых рецепторных участков и аденилатциклазы, о чем пойдет речь ниже.

## IV. СВОЙСТВА РАСТВОРИМЫХ РЕЦЕПТОРОВ ЛГ/ХГ

### А. Солюбилизация рецепторов гонадотропинов

Из большого числа агентов, используемых для солюбилизации мембранных компонентов, для экстракции растворимой формы гормональных рецепторов широкое применение нашли лишь неионные детергенты. Для солюбилизации рецепторов ЛГ/ХГ семенников и яичников были использованы тритон Х-100 и луброл [55—63]. Экстрагируемые детергентами рецепторы гонадотропинов обеих тканей обладают в целом сходными физическими свойствами: при гель-фильтрации на сефарозе 6В и центрифугировании в сахарозном градиенте плотности они ведут себя как соединения, имеющие асимметричные молекулы с гидродинамическим радиусом 6,4—7,0 нм и мол. весом приблизительно 200000. Различие в константах седиментации свободных рецепторов (6,5 S) и гормон-рецепторных комплексов (7,5—8,8 S) соответствует допущению о том, что одна рецепторная молекула связывает одну молекулу гонадотропина (мол. вес 38000, 2,9 S). Не удивительно, что после экстракции рецепторов гонадотропинов или гормон-рецепторных комплексов различными неионными детергентами было выделено несколько форм рецепторов, хотя все эти формы и характеризуются довольно близкими коэффициентами седиментации (7,5—8,8 S) и достаточно близкими радиусами Стокса (6,4—7,0 нм). Для того чтобы показать наличие высокомолекулярных гормон-рецепторных комплексов и чтобы отделить свободный меченый ХГ человека от гормона, связанного с рецепторами, был использован также аналити-

ческий электрофорез в 10%-ном полиакриламидном геле, содержащем тритон (рис. 5).

Связывающие характеристики солюбилизируемых детергентом рецепторов очень близки к аналогичным характеристикам связывающих участков в исходных фракциях частиц; у солюбилизированных рецепторов отмечается лишь небольшое уменьшение рав-

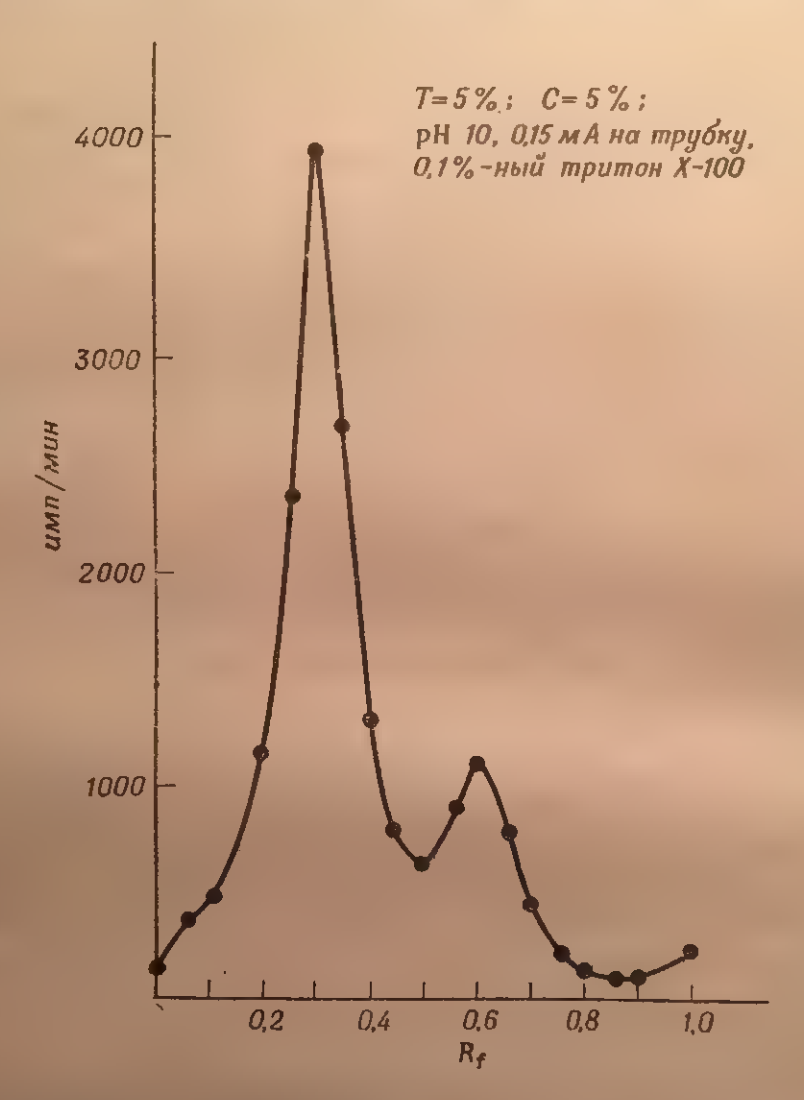



**Рис. 5.** Электрофорез в полиакриламидном геле гормон-рецепторных комплексов (8,8 S), солюбилизированных тритоном.

новесной константы ассоциации [56]. Но стабильность растворенных свободных рецепторов оказывается значительно сниженной по сравнению со стабильностью рецепторов в составе частиц. Так, при хранении растворенных рецепторов при 4° С существенное снижение связывающей активности обнаруживается уже через 24 ч. Такую лабильность рецепторов можно объяснить присутствием в неочищенных экстрактах протеолитической и липолитической активности, поскольку очистка рецепторов сопровождается заметным увеличением их стабильности [64].

Интересно отметить, что после экстракции рецепторов гонадотропинов различными детергентами обнаруживаются несколько форм гормон-рецепторных комплексов, причем в определенных условиях эти формы регулярно воспроизводятся для каждого из детергентов (табл. 1). Интерпретировать существование различ-

*Таблица 1*

**Физические характеристики солюбилизированных детергентами рецепторов гонадотропинов**

| Процедура экстракции | Препарат | Константа седиментации, $S$ | $K_{av}$ (сефароза 6В) | Радиус Стокса, нм | Фрикционное отношение | Кажущийся мол. вес |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Тритон X-100 | Свободный рецептор | 6,5±0,12 (3) | 0,32 (3) | 6,4 | 1,65 | 194 300 |
| | Уравновешенный комплекс рецептора с ХГ человека | 7,5±0,35 (5) | 0,32 (5) | 6,4 | 1,56 | 224 000 |
| | Диализованный комплекс рецептора с ХГ человека (7,5 $S$) | 8,8 (3) | 0,27 (3) | 7,4 | | |
| | Предобразованный во фракции частиц комплекс рецептора с ХГ человека | 8,8±0,09 (10) | 0,31 (3) | 6,4 | 1,47 | 270 000 |
| Луброл WX | Предобразованный комплекс | 7,0 (4) | 0,26 (3) | 7,7 | 1,87 | 236 200 |
| Луброл PX | Предобразованный комплекс | 7,0 (3) | 0,32 (3) | 6,4 | 1,64 | 196 000 |
| Тритон X-100 | ХГ человека | 2,9 | 0,56 (10) | 3,4 | 1,4 | 38 000 |

ных форм растворимых рецепторов довольно сложно, так как на скорость седиментации может влиять связывание детергента и изменение конформации рецепторных молекул. По всей вероятности, причиной появления ряда форм рецепторов, обнаруживаемых при различных условиях экстракции детергентом, являются изменения в симметрии рецепторных молекул или в степени их ассоциированности друг с другом. Поскольку рецепторы адсорбируются конканавалином А, присоединенным к сефарозе, в состав рецепторных молекул, по-видимому, входит углеводный компонент. А это также может быть причиной кажущейся асимметрии молекул рецепторов, выявляемой по несоответствию между их гидродинамическим радиусом и скоростью седиментации.

**Б. Действие на рецепторы гонадотропинов ферментов и восстановителей**

Обработка рецепторов, находящихся в растворенном виде или в составе частиц, нейраминидазой, РНКазой или ДНКазой не влияет на связывание ими меченого ХГ человека. В то же время

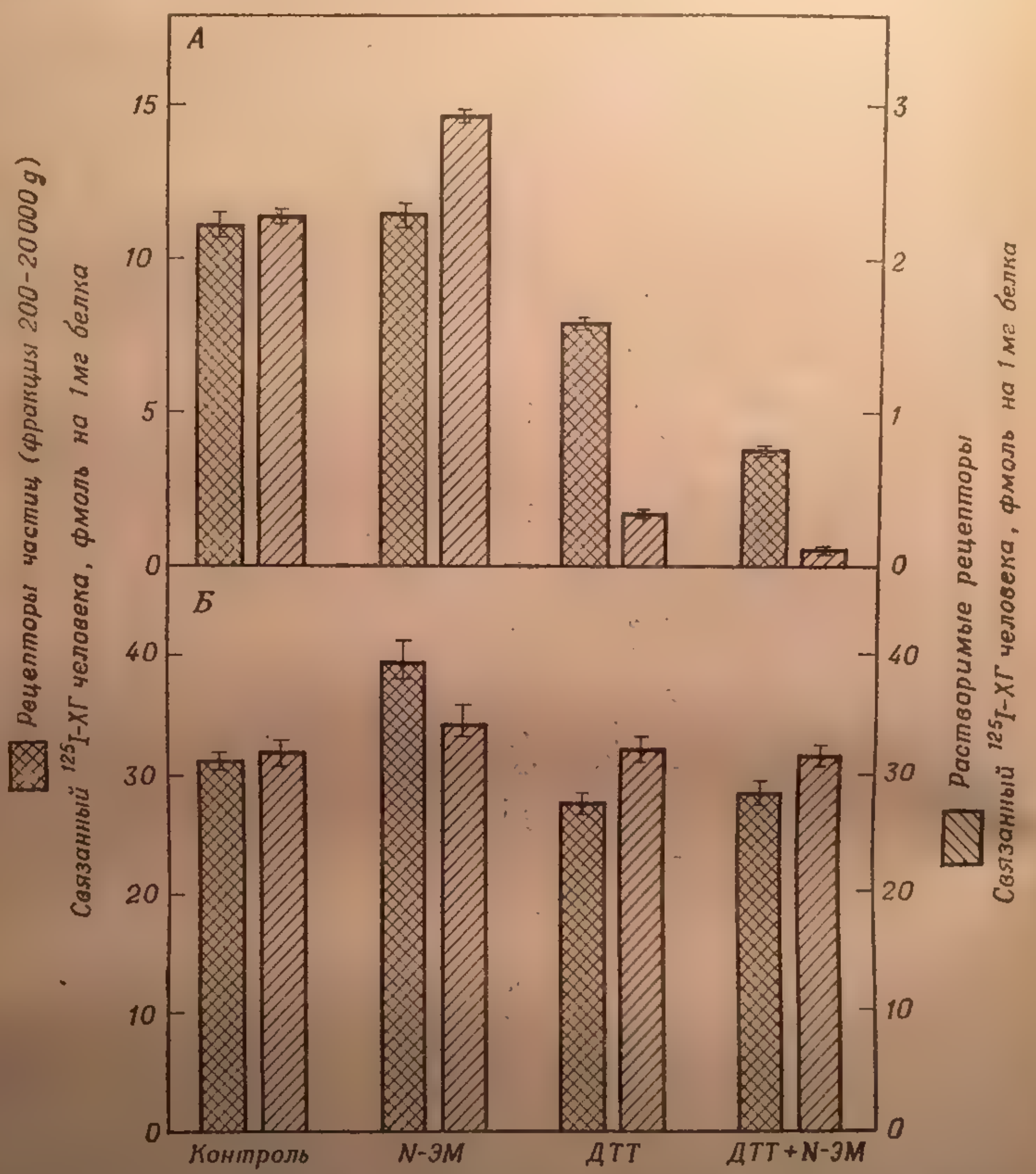



**Рис. 6.** *А.* Восстановление и алкилирование свободных рецепторов: связывание $^{125}$I-ХГ человека рецепторами гонадотропинов из фракции частиц и растворимой фракции, которые предварительно обрабатывали дитиотрейтолом (ДТТ) (4 мМ, 60 мин, 22° С) и (или) N-этилмалеимидом (N-ЭМ) (20 мМ, 120 мин, 22° С). Специфическое связывание гонадотропина выражено в фемтомолях на 1 мг белка; каждая величина представляет собой среднее из четырех определений±стандартное отклонение. *Б.* Восстановление и алкилирование предобразованных гормон-рецепторных комплексов: удержание связанного $^{125}$I-ХГ человека рецепторами семенников из фракции частиц и растворимой фракции после обработки гормон-рецепторных комплексов ДТТ и (или) N-ЭМ.

## Б. Действие на рецепторы гонадотропинов ферментов и восстановителей

Обработка рецепторов, находящихся в растворенном виде или в составе частиц, нейраминидазой, РНКазой или ДНКазой не влияет на связывание ими меченого ХГ человека. В то же время

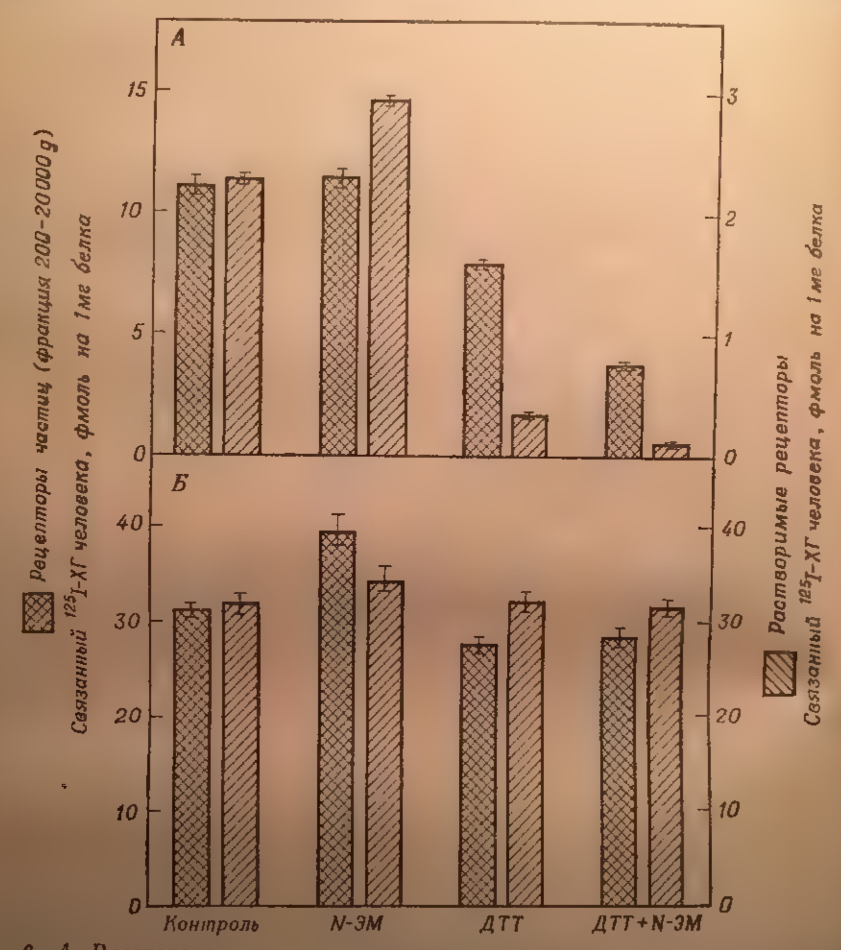



**Рис. 6.** *А.* Восстановление и алкилирование свободных рецепторов: связывание $^{125}$I-ХГ человека рецепторами гонадотропинов из фракции частиц и растворимой фракции, которые предварительно обрабатывали дитиотрейтолом (ДТТ) (4 мМ, 60 мин, 22° С) и (или) N-этилмалеимидом (N-ЭМ) (20 мМ, 120 мин, 22° С). Специфическое связывание гонадотропина выражено в фемтомолях на 1 мг белка; каждая величина представляет собой среднее из четырех определений±стандартное отклонение. *Б.* Восстановление и алкилирование предобразованных гормон-рецепторных комплексов: удержание связанного $^{125}$I-ХГ человека рецепторами семенников из фракции частиц и растворимой фракции после обработки гормон-рецепторных комплексов ДТТ и (или) N-ЭМ.

инкубация рецепторов с трипсином полностью снимает их способность связывать гонадотропин, что и должно было бы происходить, если бы рецепторы являлись компонентами мембран, состоящими преимущественно из белка. На возможное присутствие в составе рецептора гонадотропинов фосфолипидного компонента указывает снижение связывающей активности, наблюдаемое после обработки свободных от гормона рецепторов фосфолипазой А [56]. Связывающая активность свободных рецепторных участков подавлялась также при восстановлении дитиотрейтолом и алкилировании N-этилмалеимидом. Это указывает на то, что в поддержании конформации и рецепторов и сохранении ими способности специфически связывать гонадотропины важную роль играют внутрицепочечные дисульфидные связи [65]. В то же время на уже образованные гормон-рецепторные комплексы восстанавливающие агенты не влияли (связанный гонадотропин из комплексов не освобождался). Поэтому можно предполагать, что в отличие от свободных рецепторов, способных связывать гормон лишь при наличии в их структуре интактных дисульфидных связей, конформационная стабильность рецепторов, находящихся в комплексе с гонадотропином, после восстановления дисульфидных связей поддерживается за счет связанного гормона (рис. 6).

## V. СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ СЕМЕННИКОВ И ЯИЧНИКОВ

### А. Ассоциированная с частицами и растворимая циклаза гонад

Как было показано, аденилатциклазные системы семенных канальцев и клеток Лейдига семенников специфически стимулируются соответственно ФСГ и ЛГ. Несмотря на то что эффекты ФСГ на ткани-мишени, как правило, труднее воспроизвести in vitro, чем эффекты ЛГ, наблюдать стимулирующее действие ФСГ на аденилатциклазу в гомогенатах семенных канальцев оказалось легче, чем аналогичный эффект ЛГ во фракциях частиц клеток Лейдига. В гомогенатах семенников и во фракциях частиц клеток Лейдига присутствует высокоактивная циклаза, о чем можно судить по стимулирующему действию фторида. Однако эффект ЛГ и ХГ человека на активность фермента относительно невелик и непостоянен. Интактные же клетки Лейдига и ткань семенников, напротив, отвечают на ЛГ и ХГ человека значительным увеличением образования цАМФ, проявляя высокую чувствительность к гормонам (см. выше). В случае гомогенатов и отдельных фракций яичников стимулирующее действие гонадотропинов на аденилатциклазу выявляется легче, чем в случае семенников. Но циклаза яичников крайне чувствительна к физической обработке; если период разрушения ткани гомогенизацией не свести к минимуму, то активность фермента быстро исчезнет. Ответ аденилатциклазы яичников крыс на гонадотропины наиболее выражен у неполово-

зрелых животных и слабеет после полового созревания или введения гонадотропинов.

После введения неполовозрелым крысам гонадотропина сыворотки крови жеребой кобылы и ХГ человека для увеличения массы яичников и их лютеинизации число рецепторов гонадотропинов значительно возрастает. Однако активность чувствительной к гонадотропинам аденилатциклазы увеличивается в меньшей степени. При изучении взаимосвязи между солюбилизированными рецепторами гонадотропинов и аденилатциклазой были использованы как фрагменты интерстициальных клеток семенников крыс, так и гомогенаты лютеинизированных яичников крыс, получивших гонадотропин сыворотки крови жеребой кобылы и ХГ человека [63]. Инкубация этих фракций частиц, выделенных из гонад в присутствии неионных детергентов — тритона Х-100, луброла РХ и луброла WX, — приводила к заметному увеличению в препаратах базальной и стимулируемой фторидом активности аденилатциклазы. Кроме того, растворимая фракция, полученная после центрифугирования при 360000 *g* в течение 3 ч обработанных детергентом частиц, обладала значительной долей активности фермента, выявлявшейся в осадках в присутствии детергента. В случае фракций частиц семенников в присутствии детергентов стимулирующего действия гонадотропинов на циклазу не наблюдалось, что находится в соответствии с данными об относительно слабом эффекте гормонов на активность фермента в исходном препарате частиц. В случае же солюбилизированных частичек яичников совместная инкубация с ЛГ этих частичек и детергента или надосадочной фракции, полученной при 360000 *g*, приводила к небольшому, но достоверному увеличению активности солюбилизированной детергентом аденилатциклазы.

Хотя активность аденилатциклазы во фракциях частиц и семенников, и яичников после обработки всеми детергентами возрастала по сравнению с соответствующим контролем, наиболее воспроизводимое и значительное увеличение активности фермента наблюдалось при использовании 0,5%-ного луброла РХ, который впоследствии был применен для солюбилизации рецепторных участков и аденилатциклазы (рис. 7). Луброл РХ в данной концентрации необходим также для предотвращения агрегации рецепторов гонадотропинов, солюбилизированных детергентами типа луброла. Уменьшение концетрации луброла, начиная с 0,3%, приводит к увеличению агрегации рецепторов, наблюдаемой при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы. Этот процесс становится значительным при концентрации луброла 0,1% (рис. 8). Способность неионных детергентов экстрагировать растворимую аденилатциклазу была показана и на ряде других тканей [66—71]. Это свойство детергентов дает хорошую возможность изучать функциональные и структурные взаимосвязи между находящимися в растворе рецепторами и циклазой. Ряд интересных

работ по растворимой аденилатциклазе миокарда опубликовали Леви и др. [48, 67, 70]. Эти исследователи показали, что чувствительность фермента к гормональной стимуляции глюкагоном или адреналином после солюбилизации теряется, но может быть восстановлена после удаления детергента и добавления определенных фосфолипидов. В наших исследованиях, выполненных на тканях

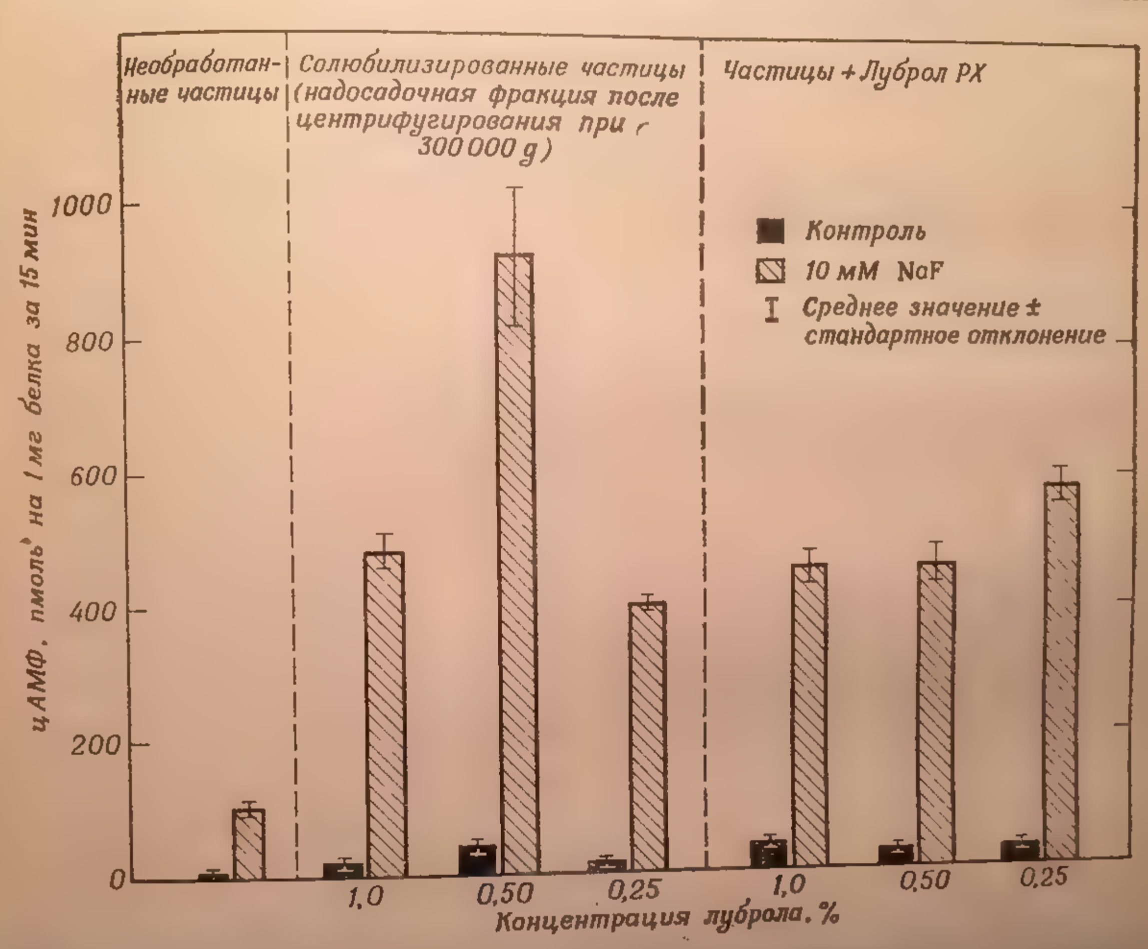



**Рис. 7.** Экстракция аденилатциклазы из семенников лубролом PX в различных концентрациях.

гонад, эффект гонадотропинов на циклазу семенников в препаратах разрушенных клеток был слабым и непостоянным, а в солюбилизированных частицах, даже в присутствии марганца, добавляемого для увеличения активности фермента, гормональная стимуляция циклазы не обнаруживалась вовсе. Ответ же аденилатциклазы гомогенатов яичников на гонадотропин был, напротив, постоянным, правда, довольно умеренным. В растворимых препаратах яичников также часто наблюдалась активация фермента, причем степень активации была примерно такой же, как и при действии гормона в гомогенатах. Подобное сохранение гормональной чувствительности у полностью растворенной аденилатциклазы в присутствии детергента является, по-видимому, довольно редким

случаем. На этом основании предполагают, что рецепторный комплекс яичников окажется наиболее подходящей моделью для изучения физических и функциональных взаимодействий между участками связывания гонадотропинов и аденилатциклазой в растворе.

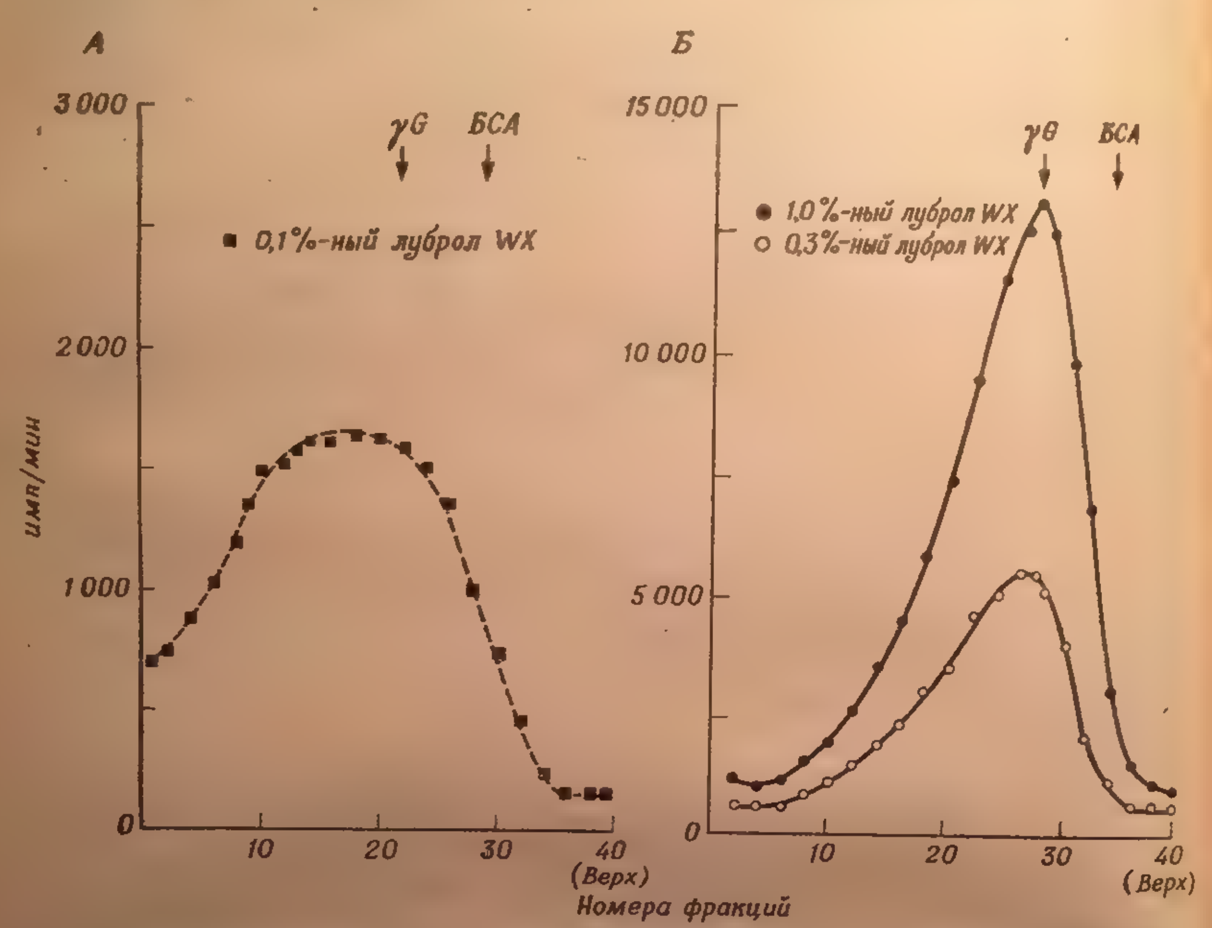



**Рис. 8.** Центрифугирование в градиенте плотности сахарозы солюбилизированных лубролом частиц, полученных из клеток семенников, меченных $^{125}$I-ХГ человека. При использовании 0,1%-ного луброла WX гормон-рецепторные комплексы частично агрегируют (*А*), а при более высоких концентрациях детергента седиментируют в области 7S (*Б*). БСА — бычий сывороточный альбумин.

## Б. Действие ионов магния и марганца на аденилатциклазу гонад

Влияние возрастающих концентраций $Mg^{2+}$ и $Mn^{2+}$ на базальную и на стимулируемую фторидом аденилатциклазную активность исследовали как в препаратах, полученных из осадков (препараты частиц), так и в растворимых препаратах семенников. Во всех экспериментах добавление марганца вызывало значительное увеличение базальной и стимулируемой фторидом активности аденилатциклазы по сравнению с пробами, содержащими магний. В препаратах частиц индуцируемое марганцем увеличение базальной и стимулируемой фторидом активности фермента не за-

висело от концентрации марганца в пределах 1—8 мМ. Если при инкубации с марганцем использовались солюбилизированные частицы, то и в этом случае базальная и стимулируемая фторидом активность циклазы была намного выше, чем при инкубации с магнием. Однако ответ аденилатциклазы на активацию фторидом

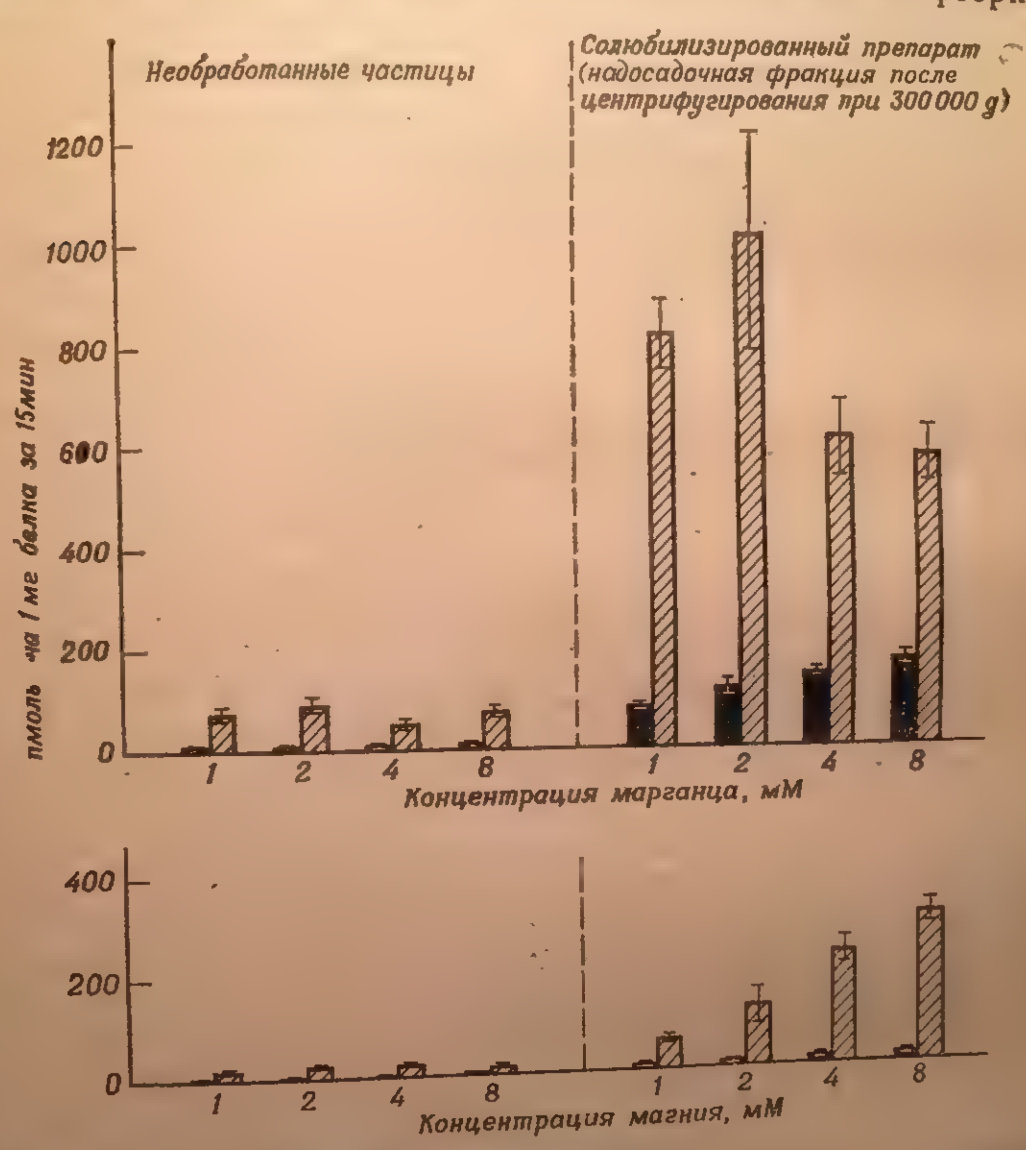



**Рис. 9.** Влияние $Mn^{2+}$ и $Mg^{2+}$ на аденилатциклазную активность в препаратах фракции частиц и растворимой фракции семенников.

при этом имел максимум в области концентраций марганца 1—2 мМ; при более же высоких концентрациях марганца эффективность фторида снижалась (рис. 9). Напомним, что в присутствии детергента эффекта ЛГ на аденилатциклазу семенников обнаружить не удается. В отличие от циклазы семенников базальная аденилатциклазная активность препаратов и частиц, и солюбилизированных фракций яичников не очень сильно возрастала при добавлении в инкубационную смесь марганца. Но зато увеличение

концентрации марганца вызывало значительную стимуляцию циклазы фторидом; оптимальный эффект достигался при концентрации марганца 4—8 мМ. Кроме того, в присутствии 1 мМ марганца стабильно наблюдалась гомональная стимуляция циклазы фракции частиц яичников овечьим ЛГ (1 мкг на пробу, около $10^{-7}$ М).

Скорость образования цАМФ во фракции частиц и в растворимых препаратах семенников определяли на протяжении 30 мин в присутствии или в отсутствие фторида или тропного гормона в среде, содержащей 2 мМ $Mn^{2+}$. В этих условиях после относительно короткого периода инкубации активность аденилатциклазы препаратов частиц менялась с течением времени. В частицах же, обработанных детергентом, и в растворимых препаратах активность фермента сильно возрастала в первые 2 мин, после чего скорость реакции оставалась постоянной в течение по крайней мере 30 мин. Величины $K_M$ для базальной и стимулируемой фторидом аденилатциклазы и АТФ в препаратах частиц, обработанных лубролом, равнялись соответственно 0,40 и 0,43 мМ, а в полностью растворенных препаратах — 0,20 и 0,23 мМ.

Факт возможности замены магния марганцем, как одного двухвалентного катиона, необходимого для работы аденилатциклазы, другим катионом, хорошо известен. В некоторых тканях активность фермента при низких концентрациях марганца оказывается более высокой, чем в присутствии той же концентрации магния. Этот эффект Mn и АТФ, по-видимому, обусловлен увеличением $V_{max}$ реакций, катализируемых базальной и стимулируемой фторидом аденилатциклазой. Но ионы марганца не увеличивают активность фермента, стимулируемую гормоном, а в некоторых случаях даже тормозят активирующее действие на аденилатциклазу пептидных гормонов [72]. Сообщалось также о наличии магнийзависимой аденилатциклазы в семенных канальцах крыс [73], но в интерстициальных клетках семенников и яичников такой фермент, насколько нам известно, не обнаружен.

## VI. ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ РАСТВОРИМЫХ РЕЦЕПТОРОВ И АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ

Для изучения вопроса о возможном существовании физической связи между находящимися в растворе аденилатциклазой и рецепторами гонадотропинов многочисленные препараты семенников и яичников крыс, солюбилизированных лубролом, были проанализированы с помощью гель-фильтрации на сефарозе 6В [63]. После хроматографии, проводившейся в присутствии детергента, в элюированных с колонки фракциях определяли с помощью $^{125}$I-ХГ-человека связывающую активность рецепторов и одновременно измеряли аденилатциклазную активность в присутствии 2 мМ $Mn^{2+}$. Такая постановка опытов позволяла сравнить профили элюции

свободных (т. е. незанятых гормоном) рецепторных участков и активности растворимого фермента. Результаты одного из подобных экспериментов представлены на рис. 10. Во всех случаях выход активности аденилатциклазы после гель-фильтрации был чрезвычайно мал. Но во всех четырех независимых друг от друга экспериментах, выполненных на солюбилизированных частицах семенников и яичников, максимальный уровень связывающей активности

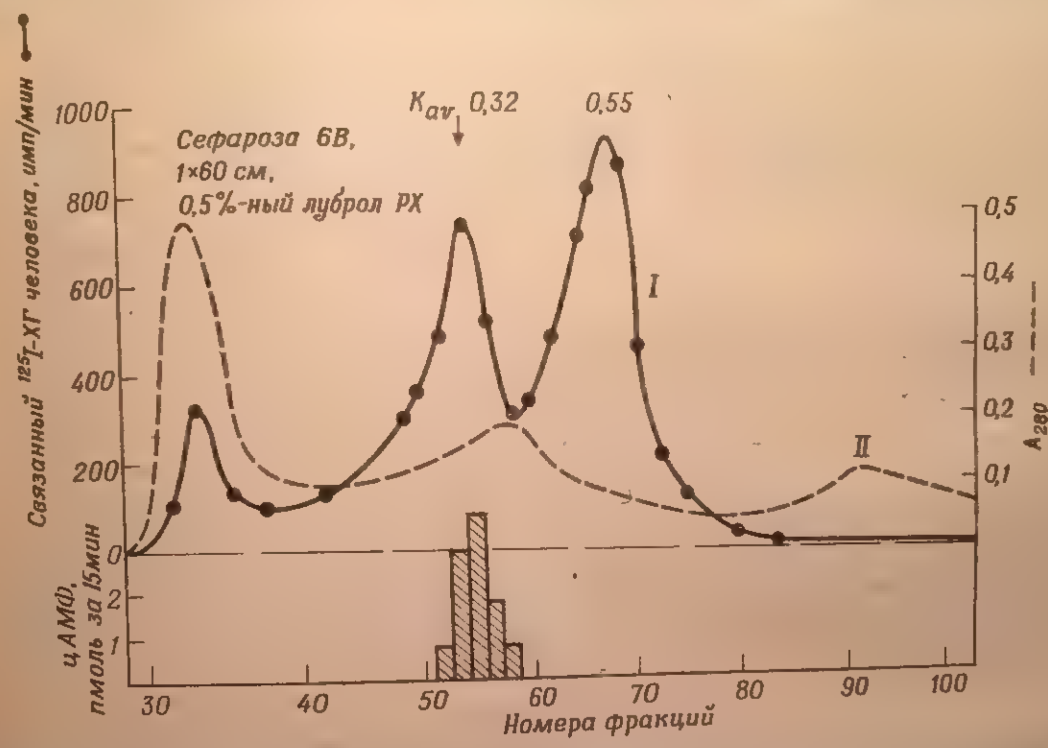



**Рис. 10.** Гель-фильтрация свободных рецепторов, солюбилизированных из частиц семенников 0,5%-ным лубролом РХ. Связывающую активность (*I*, сплошная линия) и активность аденилатциклазы в присутствии 2мМ $Mn^{2+}$ (заштрихованные столбики) в аликвотах фракций измеряли одновременно. *II* — оптическая плотность при 280 нм.

с $K_{av}$=0,36—0,40 совпадал с небольшим пиком аденилатциклазной активности. Эти результаты позволяют предполагать, что растворимые рецепторы или их комплексы могут одновременно содержать и участок связывания гормона, и аденилатциклазу. Очевидно, для того, чтобы выяснить, существует ли такая связь рецепторов и циклазы в действительности, необходимо подтвердить полученные данные с помощью других методов разделения, обладающих более высокой разрешающей способностью. При анализе экстрактов семенников с помощью гель-фильтрации максимум элюции базальной и стимулируемой фторидом активности аденилатциклазы совпадал с пиком связывающей активности, имевшим $K_{av}$ 0,32. В случае экстрактов яичников во фракциях, элюируемых с колонки, не удавалось обнаружить растворимой аденилатциклазной активности, стимулируемой фторидом. Но базальная

активность фермента снова элюировалась с колонки вместе с пиком связывания, имевшим $K_{av}$ 0,36.

В некоторых из проведенных экспериментов наблюдался дополнительный пик связывающей активности с $K_{av}$ 0,55. Этот пик связывания, элюируемый в области белков с меньшим молекулярным весом, никогда не совпадал с аденилатциклазной активностью — ни базальной, ни стимулируемой фторидом. Подобные более низкомолекулярные связывающие компоненты не обнаруживались в ранее проведенных экспериментах по солюбилизации рецепторов семенников и яичников тритоном Х-100 [56—58]. В этих исследованиях было показано наличие лишь одного пика связывания с $K_{av}$=0,32 при гель-фильтрации на сефарозе 6В, который при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы соответствовал константе седиментации 6,5 S. Описанный выше второй пик связывающей активности, возможно, обусловлен диссоциирующим действием луброла на незанятые гормоном рецепторы частичек гонад во время солюбилизации. Соответствующий этому пику компонент является, вероятно, свободным связывающим участком, отделившимся от комплекса рецептор — циклаза в процессе экстракции детергентом и последующей гель-фильтрации растворимого препарата. При изучении связывания глюкагона в солюбилизированном детергентом препарате аденилатциклазы миокарда также было выдвинуто предположение о возможном отделении рецепторной связывающей активности от активности растворимого фермента [48].

## VII. ОЧИСТКА РАСТВОРИМЫХ РЕЦЕПТОРОВ ГОНАДОТРОПИНОВ

Выяснению условий очистки специфических рецепторов гонадотропинов из солюбилизированных детергентом препаратов связывающих гормон фракций частиц гонад было посвящено несколько исследований [63, 64]. В качестве исходного материала была использована фракция разрушенных интерстициальных клеток семенников половозрелых крыс, которую получали фрагментацией семенных канальцев и отделением фракции, осаждающейся при 200—20 000 g [56]. Связывание определяли в равновесных условиях с помощью биологически активного меченного $^{125}I$ ХГ человека (10 000 МЕ/мг), который получали иодированием лактопероксидазным методом [61]. Удельная радиоактивность меченого гормона, которую измеряли методом конкурентного анализа, обычно составляла 40 000—100 000 расп./мин на 1 нг.

При изучении очистки растворимых рецепторов гонадотропинов их получали экстракцией частиц интерстициальных клеток 1%-ным тритоном Х-100 в течение 30 мин при 4° С. Затем суспензию разводили физраствором, содержащим фосфатный буфер pH 7,4, до концентрации тритона 0,2% и центрифугировали при 360 000 *g* 1 ч при 4° С. Прозрачный надосадочный раствор содер-

жал основную массу (около 90%) участков связывания гонадотропина, солюбилизированных из исходной фракции частиц. Связывающую емкость солюбилизированных рецепторов гонадотропинов в процессе очистки определяли с помощью количественного анализа связывания путем уравновешивания рецепторов с возрастающими концентрациями немеченого ХГ человека в присутствии постоянного количества (60 000 имп/мин) $^{125}$I-ХГ человека. Результаты по торможению связывания представляли в виде кривых насыщения или в виде графиков Скэтчарда. При расчетах констант связывания гонадотропина проводили коррекцию на удельную радиоактивность, на максимальную связывающую активность и на биологическую активность меченого ХГ человека [37].

### А. Аффинная хроматография

Аффинные матриксы для хроматографического выделения рецепторов ЛГ/ХГ получали присоединением частично очищенного ХГ человека к гранулам агарозы с помощью различных методов. В экспериментах с ХГ человека, непосредственно присоединенным либо к активированной цианогенбромидом сефарозе, либо к комплексу сефароза — конканавалин А, захват рецепторов гонадотропинов из раствора гелем, содержащим ХГ человека, был почти полным. Но при последующем элюировании рецепторов при самых разных условиях диссоциации выход рецепторной связывающей активности был относительно низким. Наиболее подходящим для аффинной хроматографии оказался комплекс гонадотропина с гелем, получаемый присоединением ХГ человека к гранулам агарозы, содержащим алифатические цепи длиной 1 нм, которые заканчиваются N-оксисукцинимидной эфирной группой (Affigel 10, Biorad). Как показала практика, самый высокий и наиболее постоянный выход растворимых рецепторных участков для гонадотропинов обеспечивала процедура диссоциации гормон-рецепторных комплексов при низких значениях pH (ранее было показано, что такая обработка вызывает отделение гонадотропина, связанного рецепторами из фракции частиц семенников [30, 36]).

Для достижения избирательной адсорбции рецепторов гонадотропинов 1 г геля агарозы с присоединенным к ней ХГ человека перемешивали в течение 16 ч при 4° C с солюбилизированными частицами, выделенными из 20—30 семенников. Суспензии геля давали осесть в небольшой колонке из полипропилена. После этого гель промывали аликвотами приготовленного на фосфатном буфере физраствора, pH 7,4 (4 мл) и аликвотами 0,025 М уксусной кислоты, pH 3,2 (4 мл), для чего гель последовательно суспендировали в соответствующем растворе и фильтровали. pH кислых элюатов немедленно доводили 0,1 М $NH_4OH$ до 7,0. Для определения рецепторной связывающей активности аликвоты элюатов уравновешивали в течение ночи при 4° C с $^{125}$I-ХГ человека.

Остальную часть нейтрализованных элюатов замораживали и лиофилизовали для того, чтобы впоследствии количественно измерить связывание и определить содержание белка.

Связывающая способность рецепторов гонадотропинов, элюированных с геля агароза — ХГ человека в первых четырех кислых фракциях, составляла 68% связывающей способности исходного материала, измеренной в нулевое время — т. е. в момент смешивания геля с рецепторами. Но связывающая способность в аликво-

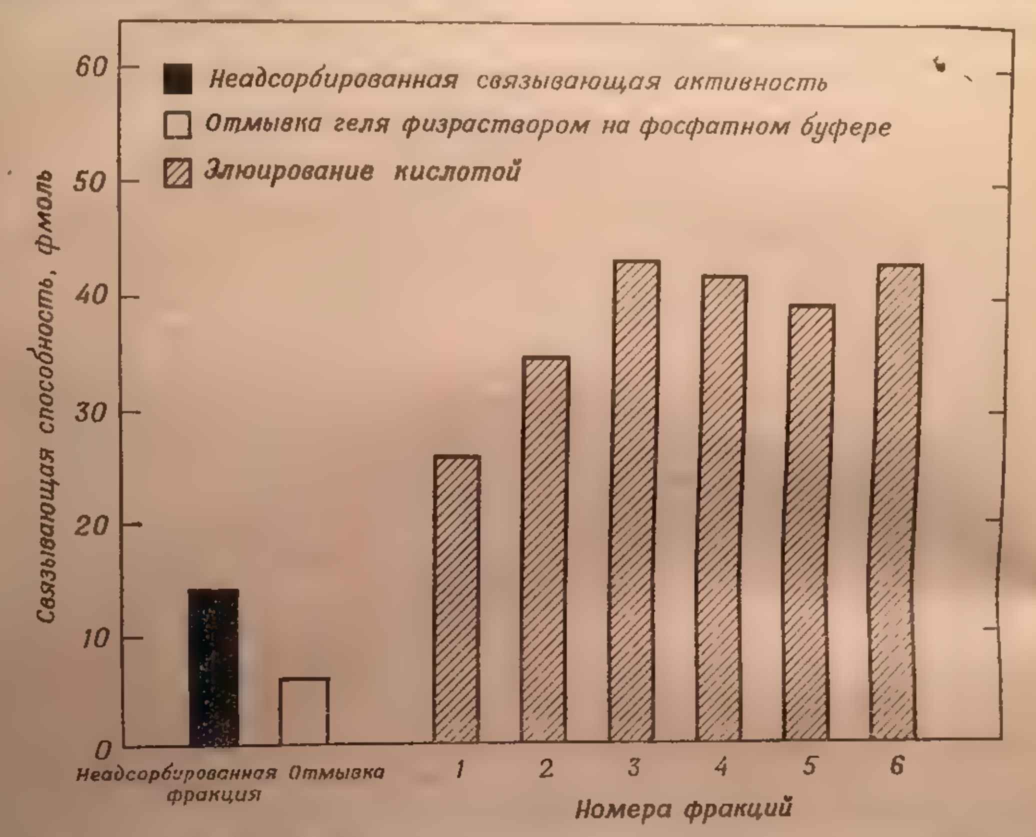



**Рис. 11.** Адсорбция и элюция рецепторов гонадотропинов с матрикса агароза — ХГ человека. Первые два столбика отражают связывающую способность соответственно в неадсорбированной фракции нанесенной на матрикс пробы и в элюате, полученном промыванием матрикса буфером. Заштрихованные столбики отражают связывающую активность рецепторов, элюируемых 0,025 М уксусной кислотой.

тах исходного раствора рецепторов, измеренная в момент элюирования кислотой, была несколько ниже, и поэтому выход элюированных рецепторов по отношению к этой величине составлял 168%. Полученное различие в выходе рецепторов обусловлено относительно быстрым разрушением неочищенных рецепторов: связывающая активность в контрольной аликвоте, хранившейся при 2° С, успевала снизиться даже за то время, пока основная часть раствора рецепторов перемешивалась с гелем, содержавшим ХГ человека.

При продолжении элюции кислотой наблюдали дальнейший выход связывающей активности во фракциях 5 и 6, а суммарная

связывающая активность в этих фракциях была такой же, как и во фракциях 3 и 4 (рис. 11). Объединенные нейтрализованные фракции 3—6 лиофилизовали, причем на заключительной стадии процесса сушки принимали особые меры по поддержанию низкой температуры образца. Суммарная связывающая способность рецепторов, элюированных во фракциях 3—6, составляла 140% измеренной в нулевой момент кажущейся связывающей способности исходного препарата. Так, солюбилизированный препарат из 16 семенников содержал 19 мг белка и 610 фмолей рецепторов, а общий выход рецепторов после очистки аффинной хроматографией составил 868 фмолей.

## Б. Свойства очищенных рецепторов

Получение солюбилизированного детергентом препарата рецепторов с выходом более чем 100% можно объяснить двумя причинами. Во-первых, во время хранения неочищенных препаратов растворимых рецепторов при 4° С происходит, как было показано, быстрая деградация рецепторов с периодом полужизни около 20 ч. Поэтому для получения истинной величины связывающей способности исходного препарата следовало бы провести коррекцию на разрушение рецепторов за 16-часовой период инкубации с гормоном при определении связывания в равновесных условиях. Для этого измеренная в эксперименте величина должна быть, по-видимому, увеличена приблизительно на 45%. Во-вторых, свободные рецепторы, элюируемые при низких значениях pH раствором, лишенным детергента, уже не подвергаются, по-видимому, воздействию со стороны молекул детергента. Поэтому и на процесс связывания гормона детергент уже не влияет. В отличие от рецепторов в исходном неочищенном растворе очищенные рецепторы весьма стабильны и могут храниться в растворе при 4° С в течение нескольких дней без потери связывающей активности. Более того, очищенные рецепторы полностью сохраняли связывающую активность после лиофилизации и хранения при —60° С в течение 8 нед.

Исследования по изучению связывания, выполненные на лиофилизованных препаратах рецепторов, показали, что рецепторы сохраняют свою специфичность в отношении ЛГ и ХГ человека и не способны реагировать с другими пептидными и гликопротеидными гормонами, включая ФСГ, ТТГ, пролактин, гормон роста и АКТГ. Анализ результатов связывания в равновесных условиях, проведенный либо непосредственно по кривой насыщения, либо с помощью координат Скэтчарда, показал наличие лишь одного класса связывающих участков с высоким сродством к ХГ человека ($K_a = 10^{10}$ $M^{-1}$) (рис. 12). Константа седиментации комплекса, образованного в результате связывания $^{125}I$-ХГ человека очищенным рецептором, по данным центрифугирования в градиенте плотности сахарозы в присутствии и в отсутствие 0,1%-ного три-

тона равна 7,5 S. В отличие от неочищенных препаратов, в которых после снижения концентрации детергента при помощи интенсивного диализа постоянно наблюдалась агрегация рецепторов в более быстро седиментирующие формы [58], рецепторы, очищенные аффинной хроматографией, при центрифугировании в сахарозном градиенте плотности в отсутствие тритона Х-100 не агрегировали.

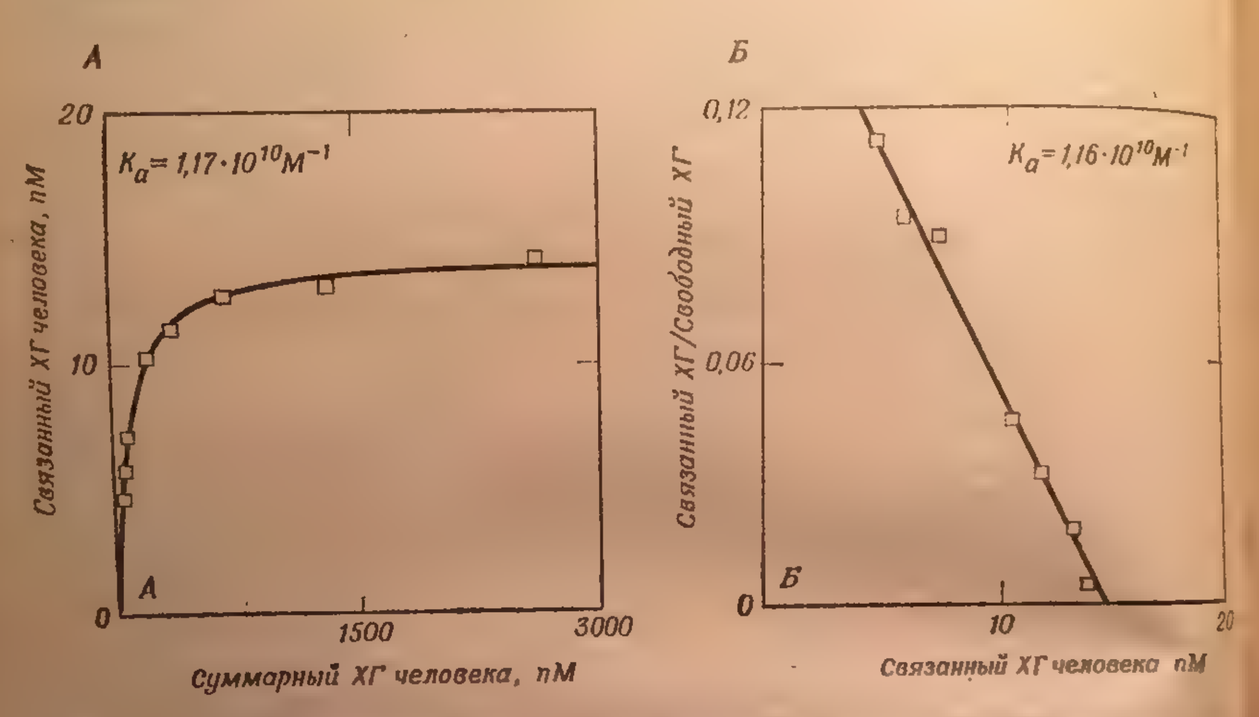



**Рис. 12.** *А.* Кривая насыщения для специфического связывания ХГ человека очищенными рецепторами, которая была получена машинной обработкой данных по общему и специфическому связыванию $^{125}$I-ХГ человека. *Б.* Скэтчардовский график результатов связывания, полученных при инкубации очищенных рецепторов с 2 нг $^{125}$I-ХГ человека и немеченым ХГ человека в возрастающих концентрациях в течение 16 ч при 4° С.

Связывающая способность рецепторов ХГ, выявляемых при их элюировании кислотой с матрикса агароза — ХГ человека, равнялась для ХГ человека приблизительно 220 пмолей на 1 мг белка. Однако если исходить из величины мол. веса рецепторов 200 000, то связывающая способность очищенных рецепторов должна приближаться к 5000 пмолей на 1 мг белка. Таким образом, для достижения гомогенности необходима дополнительная очистка в 20—25 раз. При помощи аналитического электрофореза в геле было установлено, что в первых двух элюируемых кислотой фракциях содержатся белковые загрязнения, которые отсутствуют в последующих фракциях элюата, содержащих рецепторы. Когда для удаления этих нерецепторных белков первые фракции отбрасывались, специфическая активность объединенных последующих фракций возрастала до 2500 пмолей на 1 мг белка, что соответствует 15 000-

кратной очистке по сравнению с исходным материалом. Чистота рецепторного препарата, получаемого аффинной хроматографией, составляет 50%, что свидетельствует о ценности данного метода выделения рецепторных участков для гормона [64]. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем ДСН, было показано, что наиболее очищенный препарат рецепторов движется как один компонент с мол. весом приблизительно 90 000. Данная величина была получена путем сравнения подвижности рецепторов с подвижностью стандартных белков и введения поправки на возможные гидрофобные эффекты. Эти данные позволяют предполагать, что экстрагируемый детергентом свободный от гормона рецептор с мол. весом 194 200 может являться димером, состоящим из двух субъединиц с мол. весом 94 000.

Описанные выше эксперименты показали, что специфические рецепторы гонадотропинов из семенников крыс после экстракции детергентом могут быть очищены в 15 000 раз при помощи одной стадии аффинной хроматографии на матриксе агароза — ХГ человека. Рецепторы были элюированы в свободной форме при pH 3,2, и они не агрегировали в отсутствие детергента. Связывающая активность очищенных рецепторов составляла 50% теоретически допустимого максимума. При этом очищенные рецепторы сохраняли высокое связывающее сродство и гормональную специфичность, которые присущи рецепторам гонадотропинов в исходных клеточных мембранах. Использование данной процедуры для очистки больших количеств рецепторных участков из семенников и яичников, по-видимому, очень эффективный подход в структурных и иммунологических исследованиях рецепторов гонадотропинов и в изучении функционального влияния связывания гормона на конфигурацию рецепторов и на активацию связанных с рецепторами ферментных систем.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lunenfeld B., Eshkol A.*, Vitam. Horm., *25*, 137.
2. *Espeland D. H., Naftolin F., Paulsen C. A.*, in: Gonadotropins (E. Rosemberg, ed.), Geron, X, Los Angeles, 1968, p. 177.
3. *DeKretser D. M., Catt K. J., Burger H. G., Smith G. C.*, J. Endocrinol., *43*, 105 (1969).
4. *Midgley A. R.*, Adv. Exp. Biol. Med., *36*, 365 (1973).
5. *Channing C. P., Kammerman S.*, Endocrinology, *92*, 531 (1973). *97*, 1157 (1975).
6. *Catt K. J., Dufau M. L., Neaves W. B., Walsh P. C., Wilson J. D.*, Endocrinology, *97*, 1157 (1975).
7. *DeKretser D. M., Catt K. J., Paulsen C. A.*, Endocrinology, *88*, 332 (1971).
8. *Catt K. J., Dufau M. L., Tsuruhara T.*, J. Clin. Endocrinol. Matab., *32*, 860 (1971).
9. *Dufau M. L., Catt K. J., Tsuruhara T.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *44*, 1022 (1971).
10. *Lee C. Y., Ryan R. J.*, Endocrinology, *89*, 1515 (1971).
11. *Vaitukaitis J. L., Hammond J., Ross G. T.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *32*, 290 (1971).

12. *Catt K. J., Tsuruhara T., Dufau M. L.*, Biochim. Biophys. Acta., *279*, 194 (1972).
13. *Catt K. J., Dufau M. L., Tsuruhara T.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *34*, 123 (1972).
14. *Rajaniemi H., Canha-Perttula T.*, Endocrinology, *90*, 1 (1972).
15. *Kammerman S., Canfield R. E.*, Endocrinology, *90*, 384 (1972).
16. *Lee C. Y., Ryan R. J.*, Proc. Natl. Acad. Sci., *69*, 3520 (1972).
17. *Leidenberger F., Reichert L. E.*, J. Endocrinol., *91*, 901 (1972).
18. *Means A. R., Vaitukaitis J. L.*, Endocrinology, *90*, 39 (1972).
19. *Tsuruhara T., van Hall E. V., Dufau M. L., Catt K. J.*, Endocrinology, *91*, 463 (1972).
20. *Ashitaka Y., Tsong Y. Y., Koide S. S.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., *142*, 395 (1973).
21. *Catt K. J., Dufau M. L.*, Adv. Exp. Med. Biol., *36*, 379 (1973).
22. *Danzo B.*, Biochim. Biophys. Acta., *304*, 560 (1973).
23. *Frowein J., Engel H., Weise H.-C.*, Nature [New Biol.], *246*, 148 (1973).
24. *Gospodarowicz D.*, J. Biol. Chem., 248, 5042 (1973).
25. *Rao Ch. V., Saxena B. B.*, Biochim. Biophys. Acta, *313*, 372 (1973).
26. *Lee C. Y., Ryan R. J.*, Biochemistry, *12*, 4609 (1973).
27. *Rajaniemi M., Vanha-Pertulla T.*, J. Endocrinol., *57*, 199 (1973).
28. *Reichert L. E., Bhalla V. K.*, Endocrinology, *94*, 483 (1974).
29. *Schwartz S., Bell J., Reichnitz S., Rabinowitz D.*, Europ. J. Clin. Invest., *3*, 475 (1973).
30. *Ketelslegers J.-M., Catt K. J.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *39*, 1159 (1974).
31. *Zeleznik A. J., Midgley A. R., Reichert L. E.*, Endocrinology, *95*, 818 (1974).
32. *Catt K. J., Tsuruhara T., Mendelson C., Ketelslegers J.-M., Dufau M. L.*, in: Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis (M. L. Dufau and A. R. Means, eds.), Plenum Press, Ney York, 1974, p. 1.
33. *Rajaneimi H. J., Hirchfield A. N., Midgley A. R.*, Endocrinology, *95*, 818 (1974).
34. *Han S. S., Rajaneimi J. J., Moon I. C., Hirshfield A. N., Midgley A. R.*, Endocrinology, *95*, 589 (1974).
35. *Dufau M. L., Catt K. J., Tsuruhara T.*, Biochim. Biophys. Acta., *252*, 574 (1971).
36. *Dufau M. L., Catt K. J., Tsuruhara T.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 2414 (1972).
37. *Ketelslegers J.-M., Knott G. D.*, Catt K. J. Biochemistry, *14*, 3075 (1975).
38. *Tsuruhara T., Dufau M. L., Hickman J., Catt K. J.*, Endocrinology, *91*, 296 (1972)..
39. *Catt K. J., Dufau M. L., Tsuruhara T.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., 36, 773 (1973).
40. *Reichert L. E., Lawson G. M., Leidenberger F. L., Trowbridge G. C.*, Endocrinology, *93*, 938 (1973).
41. *Goldenberger R. L., Vaitukaitis J. L., Ross G. T.*, Endocrinology, *90*, 1492 (1972).
42. *Means A. R., Huckins C.*, in: Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis (M. L. Dufau and A. R. Means, eds.), Plenum Press, Ney York, 1974, p. 145.
43. *Dufau M. L., Tsuruhara T., Catt K. J.*, Biochim. Biophys. Acta, *278*, 281 (1972).
44. *Lefkowitz R. J., Roth J., Pricer W., Pastan I.*, Proc. Natl. Acad. Sci., *65*, 745 (1970).
45. *Rodbell M., Krans M. J., Pohl S. L., Birnbaumer L.*, J. Biol. Chem., *246*, 1861 (1971).
46. *Goldfine I. D., Roth J., Birnbaumer L.*, J. Biol. Chem., *247*, 1211 (1971).
47. *Boeckart J., Roy C., Rajerison R., Jard S.*, J. Biol. Chem., *248*, 5922 (1973).
48. *Levey G. S., Fletcher M. A., Klein I., Ruiz E., Schenk A.*, J. Biol. Chem., *249*, 2665 (1974).
49. *Catt K. J., Watanbe K., Dufau M. L.*, Nature, *239*, 280 (1972).
50. *Dufau M. L., Watanbe K., Catt K. J.*, Endocrinology, *92*, 6 (1973).
51. *Catt K. J., Dufau M. L.*, Adv. Exp. Biol. Med., *36*, 379 (1973).
52. *Moyle W. R., Ramachandran J.*, Endocrinology, *93*, 127 (1973).
53. *Catt K. J., Dufau M. L.*, Nature [New Biol. J.], *244*, 219 (1973).

54. *Mendelson C., Dufau M., Catt K. J.*, (в печати).
55. *Dufau M. L., Catt K. J.*, Bature [New Biol.], *242*, 246 (1973).
56. *Dufau M. L., Charreau E. H., Catt K. J.*, J. Biol. Chem., *248*, 6973 (1973).
57. *Dufau M. L., Charreau E. H., Ryan D., Catt K. J.*, FEBS Lett., *39*, 149 (1974). Targer pflaéJ1MnSJt2York
58. *Charreau E. H., Dufau M. L., Catt K. J.*, J. Biol. Chem., *294*, 4189 (1954).
59. *Dufau M. L., Charreau E. H., Ryan D., Catt K. J.*, in: Hormone Binding and Targer Cell Activation in the Testis (M. L. Dufau and A. R. Means, eds.), Plenum Press, New York, 1974, p. 145.
60. *Catt K. J., Dufau M. L.*, Methods Enzymol., *37B*, 167 (1974).
61. *Dufau M. L., Podesta E., Catt K. J.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *72*, 1272 (1975).
62. *Dufau M. L., Catt K. J.*, FEBS Lett., 52, 273 (1975).
63. *Dufau M. L., Mendelson C., Podesta E., Ryan D., Baukal A., Catt K. J.*, in: Fertility Regulation Through Basic Research. Plenum Press, New York, 1975.
64. *Dufau M. L., Ryan D., Baukal A., Catt K. J.*, J. Biol. Chem. *250*, 4822 (1975).
65. *Dufau M. L., Ryan D., Catt K. J.*, Biochim. Biophys. Acta., *343*, 417 (1974).
66. *Sutherland E. W., Rall T. W., Menon T.*, J. Biol. Chem., *237*, 1220 (1962).
67. *Levey G. S.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *38*, 86 (1970).
68. *Stansfield D. A., Franks D.*, Biochem. Biophys. Acta, *242*, 606 (1971).
69. *Birnbaumer L., Pohl S. L., Rodbell M.*, J. Biol. Chem., *246*, 1857 (1971).
70. *Levey G. S.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., *185*, 449 (1972).
71. *Johnson R. A., Sutherland E. W.*, J. Biol. Chem., *248*, 5114 (1971).
72. *Perkins J. P.*, Adv. Cyclic Nucleotide Res., *3*, 1 (1973).
73. *Braun T.*, in: Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis (M. L. Dufau and A. R. Means, eds.), Plenum Press, New York, 1974, p. 243.

## Глава 9

# РЕЦЕПТОРЫ ГОРМОНА РОСТА

*М. ЛЕСНЯК И Ф. ГОРДЕН*

Diabetes Branch
National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland

## I. ВВЕДЕНИЕ

Полипептидные гормоны действуют на самые разнообразные ткани, вызывая множество различных ответов. Комплекс взаимодействий, приводящих к ответу, для большинства гормонов окончательно не выяснен, но первая стадия в этой сложной цепи событий — связывание гормона со специфическим рецептором в клетке — может быть изучена с помощью гормонов, меченных радиоактивным иодом с высокой удельной активностью, и соответствующих клеточных или субклеточных компонентов, содержащих специфические рецепторы.

В этой главе мы рассмотрим взаимодействие гормон — рецептор на примере гормона роста [ГР] и обсудим, как при связывании этого гормона проявляются черты, характерные для других полипептидных гормонов [1]. Хотя у нас нет ясного представления о событиях, происходящих после связывания гормона и приводящих к данному ответу, как нет и прямых доказательств связи рецептора с ответом, мы покажем, каким образом это взаимодействие гормон — рецептор используется для изучения физических характеристик рецептора и для оценки физиологической активности гормонов роста в биологических тканях и жидкостях, например с помощью радиорецепторного метода [2, 3].

## II. РЕЦЕПТОРЫ ГОРМОНОВ В ЛИМФОЦИТАХ

Тщательно исследуя различные ткани, Гавин и сотр. [4, 5] обнаружили, что биологически активный $^{125}$I-инсулин специфически связывается перевиваемой культурой лимфоцитов человека. Продолжая их исследования, мы показали специфическое связывание гормона роста человека (чГР) с теми же клетками [6, 7], а недавно Маркс и сотр. [8] описали специфическое связывание кальцитонина с культивируемыми лимфоцитами. Хотя данные о специфи-

ческом связывании инсулина, чГР и кальцитонина являются лишь эмпирическими наблюдениями, так как лимфоциты, насколько известно, не являются главными клетками-мишенями для этих гормонов, мы можем использовать эту систему при сравнении характеристик трех отдельных связывающих мест для трех различных гормонов в одних и тех же или подобных клетках.

## А. Физические характеристики связывания гормонов

Для осуществления гормон-рецепторного взаимодействия необходимы соответствующие условия, такие, как определенные pH, температура и ионная сила. При определении оптимальных условий связывания следует учитывать, что условия in vitro существенно влияют на конечный результат многих процессов. К этим отличающимся друг от друга, но протекающим одновременно процессам относятся связывание меченого гормона, деградация меченого гормона, деградация рецептора, неспецифическое связывание и т. д. (Под неспецифическим связыванием мы понимаем связывание иодированного гормона в присутствии избытка немеченого гормона.)

При оптимальных условиях взаимодействия чГР с рецептором равновесное состояние достигается через 90—120 мин при 30° С в широких пределах pH (6,4—8,0), а ионы кальция и магния (1—

*Таблица 1*

**Оптимальные условия связывания гормонов лимфоцитами в культуре** [1]

| Гормон | Метка[2], М | Температура, °С | Время, необходимое для достижения равновесного состояния, мин | Оптимальный pH | Деградация при инкубации | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | меченого гормона | рецептора[3] |
| Гормон роста (человек) [7] | $^{125}$I-чГР ($2,2\cdot10^{-11}$) | 30 | 90 | 6,6—8,0 (7,0) | <10% за 4 ч | ~10% за 4 ч |
| Инсулин (свинья) [5] | $^{125}$I-инсулин ($1,7\cdot10^{-11}$) | 15 | 90 | 7,8 | То же | <10% за 4 ч |
| Кальцитонин (лосось) [8] | $^{125}$I-кальцитонин ($1,4\times10^{-12}$) | 30 | 240 | 7—8 (7,5) | | |

[1] Клетки, содержащие рецепторы с высоким сродством и высокой связывающей активностью, особенно для чГР и инсулина, отобраны в результате исследования большого числа линий лимфоцитов [9, 10]. Для широкого исследования связывания чГР и инсулина использовали клетки линий 4265 и IM-9, а для связывания кальцитонина — клетки линии 8866.

[2] Гормоны с высокой удельной активностью получали хлораминным методом.

[3] Культивированные клетки IM-9.

10 мМ) не влияют на связывание. В этих условиях после достижения максимального связывания $^{125}$I-чГР добавлением избытка немеченого чГР (10 мкг/мл) можно достичь вытеснения меченого гормона из комплекса [7].

Оптимальные условия связывания для разных гормонов даже в одной и той же культуре клеток (табл. 1) наряду со сходством имеют и различия. чГР и кальцитонин не имеют строго определяемого оптимума значений pH, в то время как оптимальные значения pH для инсулина лежат в узких пределах. Связывание меченого чГР достигает равновесия через 90 мин при 30° С, меченого кальцитонина — через 240 мин при 30° С, а меченого инсулина — через 90 мин при 15° С. В культивируемых лимфоцитах не наблюдается заметной деградации $^{125}$I-чГР или $^{125}$I-инсулина. При инкубации $^{125}$I-чГР с культурой клеток в течение 4 ч при 30° С в продуктах деградации обнаруживается меньше 15% метки [8]. Клеточная культура с низкой плотностью клеток не действует на кальцитонин в течение 4 ч инкубации при 30° С [8]. После преинкубации клеток в отсутствие меченого гормона в буфере, в котором проводится испытание, в течение различных отрезков времени (до 4 ч при 30° С для рецепторов чГР и 4 ч при 15° С для рецепторов инсулина) теряется всего 10% связывающей активности клеток. Эти исследования показывают, что в условиях инкубации как меченый гормон, так и его рецептор деградируют очень слабо (в случае чГР и инсулина).

### Б. Параметры равновесного состояния связывания гормонов

После установления оптимальных условий связывания in vitro можно приступать к изучению различных физических характеристик рецептора. При инкубации $^{125}$I-чГР с культурой лимфоцитов в оптимальных условиях в отсутствие или в присутствии чГР в возрастающих концентрациях после достижения равновесия наблюдается прогрессивное уменьшение связывания меченого гормона клетками. Дальнейший анализ кривой доза — ответ для конкурентного связывания позволяет рассчитать относительное сродство связывающих мест и их число. Чтобы определить относительное сродство и общее число рецепторов ($R_0$), на основании данных доза — ответ строят график зависимости отношения связанный меченый гормон/свободный меченый гормон (B/F) от общей концентрации связанного гормона [B] (анализ Скэтчарда в модификации Берсона и Ялоу [11]). Линейная зависимость отношения B/F от [B] для чГР указывает на одинаковое сродство связывающих мест в широких пределах концентраций гормона (от $1 \cdot 10^{-11}$ до $1 \cdot 10^{-9}$ М) [7, 10]. Наоборот, для инсулина примерно в тех же пределах концентраций ($1 \cdot 10^{-11}$—$1{,}6 \cdot 10^{-9}$ М) [5, 12] подобный график (табл. 2), построенный по данным доза — ответ, не линеен (впадина — подъем). Как интерпретировали эти данные Де Мейтс и сотр. [12], не-

*Таблица 2*

**Кинетические параметры связывания гормонов**

| Гормон | График Скэтчарда | Число связывающих мест[1] | Константа равновесия $K_a$, $М^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| Гормон роста (человек) [7] | Линейный (один порядок $K_a$ для всех рецепторов) | 4 000 | $1,3 \cdot 10^9$ |
| Инсулин (свинья) [5] | Криволинейный (отрицательная кооперативность) | ~12 850 | —[2] |
| Кальцитонин (лосось) [8] | Линейный (один порядок $K_a$ для всех рецепторов) | 100—600 | $4 \cdot 10^{10}$ |

[1] Число связывающих мест рассчитано на основании значения $[R_0]$ и количества клеток в инкубационной пробе.

$$\text{Число мест на клетку} = \frac{[R_0]\ (\text{моль}) \cdot 6{,}02 \cdot 10^{23}\ (\text{число Авогадро})}{\text{Число клеток/л}}.$$

[2] При постоянно изменяющемся сродстве не имеет смысла определять значение $K_a$ для различных отрезков криволинейного графика Скэтчарда. Общая концентрация связывающих мест остается постоянной.

линейный характер графика для инсулина отражает происходящие между рецепторами инсулина взаимодействия, индуцированные рецепторами, занятыми гормоном.

Де Мейтс и др. [10, 12] показали, что диссоциация комплекса инсулина с рецептором зависит от степени занятости рецепторов. Так, при бесконечном разбавлении в отсутствие немеченого гормона скорость диссоциации меченого инсулина из комплекса ниже, чем при бесконечном разбавлении, но в присутствии немеченого гормона (т. е. при более высокой занятости рецепторов гормоном). Эти взаимодействия между рецепторами (ингибирующее влияние связывания одной молекулы инсулина на сродство свободных рецепторов) называют «отрицательной кооперативностью» [10, 12]. В отличие от инсулина меченый чГР диссоциирует из комплекса с одинаковой скоростью как при разбавлении в отсутствие немеченого чГР, так и при разбавлении с добавлением немеченого чГР [12]. Отсутствие взаимодействия между рецепторами ГР обусловливает одинаковое для всех рецепторов сродство к гормону, как этого и следовало ожидать на основании линейности графика Скэтчарда. Анализ графика Скэтчарда для кальцитонина свидетельствует о наличии в культуре лимфоцитов единственного класса связывающих мест, имеющих одинаковое высокое сродство [8]. Результаты, полученные для всех исследованных к настоящему времени лимфоидных культур, указывают на то, что число связывающих мест, приходящееся на одну клетку, для чГР всегда меньше, чем для инсулина [9, 10]. Общее число связывающих мест для кальцитонина, по-видимому, еще меньше, чем для чГР (табл. 2).

## III. СПЕЦИФИЧНОСТЬ РЕЦЕПТОРОВ ГР

### А. Специфичность культуры лимфоцитов по отношению к чГр

Помимо способности связываться с высоким сродством, ГР должен обладать и соответствующей специфичностью к рецептору. Специфичность связывания может быть предсказана на основании биологической активности препаратов ГР человека. Клетки линии IM-9, как и клетки линии 4265, связывают чГР, но $^{125}$I-чГР не кон-

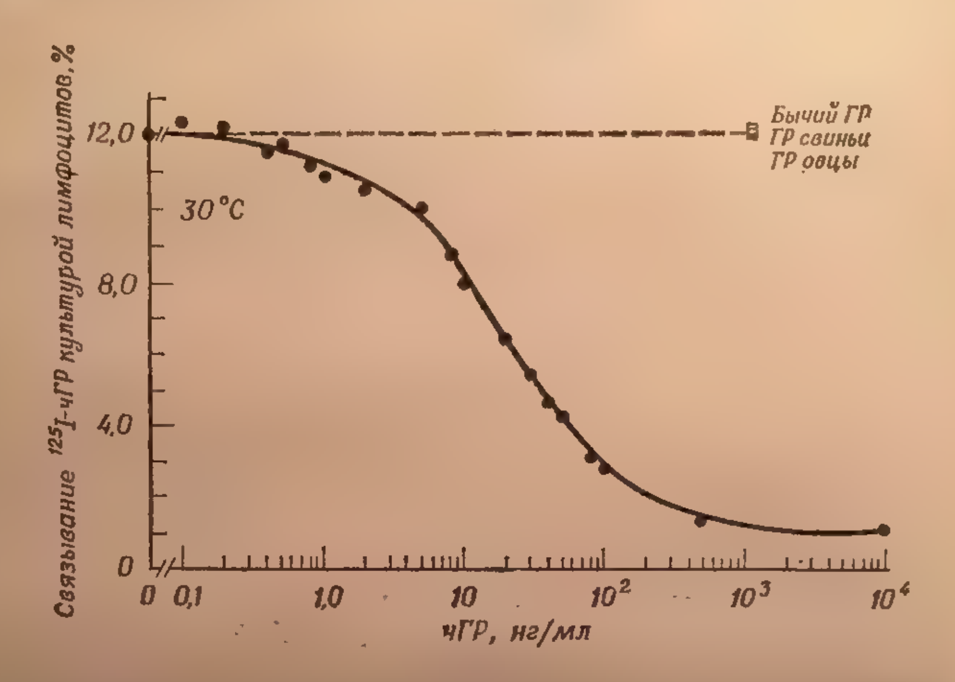



**Рис. 1.** Стандартная кривая связывания чГР с рецептором в культуре лимфоцитов человека (IM-9). Немеченый чГР (но не ГР животных, не относящихся к приматам) конкурирует с $^{125}$I-чГР [7]. Следует обратить внимание на то, что при определении радиорецепторным методом связывание дозы зависит от гормона в переделах концентраций 2—100 нг/мл.

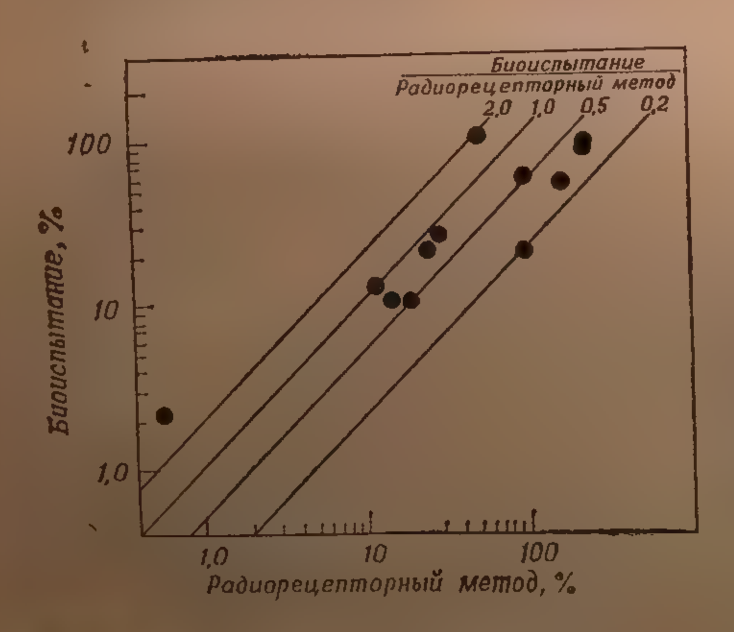



**Рис. 2.** Корреляция между результатами биоиспытания и радиорецепторного метода для нескольких препаратов чГР гипофиза с различной активностью (при биоиспытании) [7]. Препараты гипофиза предоставлены д-ром Вильгельми и National Pituitary Agency.

курирует за связывание с другими гормонами (например, с инсулином и тиротропным гормоном) или с гормонами роста животных, не относящихся к приматам; так, бычий, свиной и овечий гормоны роста (1,0 мкг/мл) не конкурируют с меченым чГР за связывание с рецепторами (рис. 1). Отметим также, что плацентарный лактоген человека, проявляющий слабую ростовую активность у человека, при конкурентном связывании с рецепторами лимфоцитов обладает менее 1% активности чГР [6, 7].

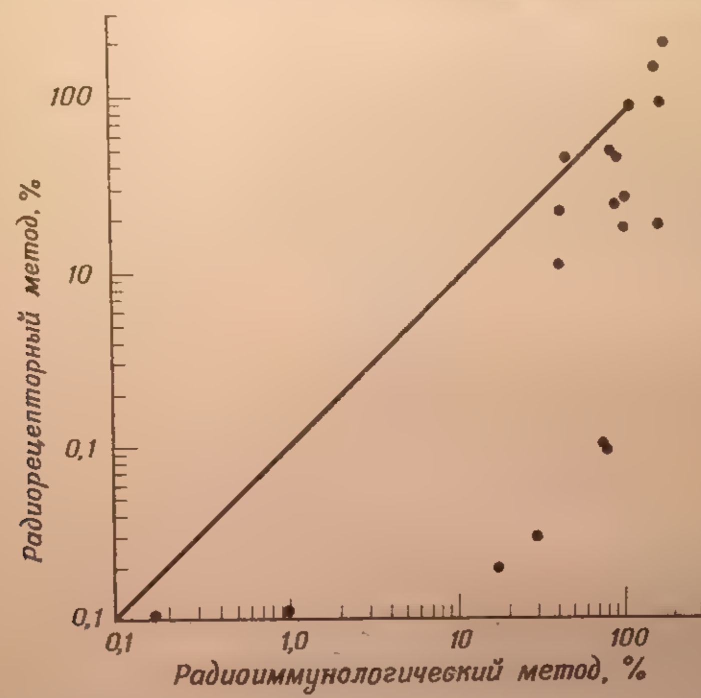



**Рис. 3.** Корреляция между результатами радиорецепторного и радиоиммунологического методов для нескольких препаратов гипофизарного чГР [7]. Радиоиммунологические эксперименты выполнены Хендрикс.

При исследовании препаратов чГР с различной степенью очистки можно сравнивать их биологическую активность (определяемую соответствующим методом на гипофизэктомированных крысах), способность связываться с рецептором (определяемую радиорецепторным методом) и иммунологическую активность (определяемую радиоиммунологическим методом). В неочищенных препаратах чГР для этих трех активностей характерен довольно низкий уровень. По мере очистки препаратов гипофиза способность к связыванию с рецептором возрастает относительно быстрее, чем биологическая активность, определяемая in vivo, но между обеими активностями в неочищенных, среднеочищенных и высокоочищенных препаратах чГР сохраняется высокая корреляция (рис. 2). На первых стадиях очистки иммунологическая активность препаратов чГР увеличивается гораздо быстрее, чем способность к связыванию с рецептором. Так, активность среднеочищенных препаратов при

испытании иммунологическим методом значительно выше, чем при испытании радиорецепторным методом. В процессе дальнейшей очистки иммунологическая активность увеличивается слабо, а способность связываться с рецептором резко возрастает, так что в высокоочищенных препаратах рецепторная и иммунологическая активности хорошо коррелируют (рис. 3) [7]. Полученные данные указывают на то, что специфичность радиорецепторной системы тесно связана со специфичностью биологического действия, а радиорецепторный и радиоиммунологический методы могут давать разные результаты. Для чГР характерно не только специфическое связывание с культурой клеток, но также и то, что его концентрация, при которой наблюдается максимальное связывание с рецептором, совпадает с физиологической концентрацией чГР in vivo, например 2,5 нг/мл немеченого чГР конкурируют за связывание с 10% $^{125}$I-чГР, а 20 нг/мл немеченого чГР тормозят связывание 50% меченого гормона (рис. 1) [7].

### Б. Специфичность других тканей к гормонам роста животных, не относящихся к приматам

Аналогично нашим данным о рецепторах гормона роста в культуре лимфоцитов человека, Цушима и Фризен [13] описали рецепторы ГР в субклеточной фракции мембран печени беременных крольчих (20—30 дней беременности). Специфичность связывания может быть предсказана на основании биологической специфичности ГР животных, не относящихся к приматам. ГР человека, обезьяны, быка и овцы сильно конкурируют с $^{125}$I-чГР за связывание с рецепторами; ГР черепахи и утки гораздо менее активны, а гормоны других животных совсем не реагируют. При сравнительном испытании препаратов чГР различной степени очистки на печени кроликов получены результаты, аналогичные вышеописанным для культуры лимфоцитов.

В отличие от рецепторных препаратов печени беременных крольчих такие же препараты печени, взятые от беременных крыс, имеют другую специфичность, более характерную для лактогенных рецепторов [15]. Так, если и чГР, и ГР быка активно реагируют с препаратами печени кроликов, то с препаратами печени крыс ГР быка, не обладающий лактогенной активностью, не реагирует [14, 16]. Причины этого интересного различия пока неясны.

Аренбрехт [17] показал, что меченый ГР быка связывается с тимоцитами мышей и телят и пролактин не конкурирует с ним за связывание. В этой еще не полностью изученной системе наиболее охарактеризовано связывание с рецепторами ГР.

## IV. ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ СВЯЗЫВАНИЕМ ГОРМОНОВ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

### А. Локализация связывающих мест

Рецептор имеет два основных свойства: а) при связывании отличает одну молекулу от другой и б) в комплексе с гормоном активирует клетку. Для понимания того, как благодаря связыванию гормона активируется какая-нибудь функция клетки, требуется знание анатомического расположения рецепторов в клетке. Преобладает мнение, что все рецепторы полипептидных гормонов локализованы на плазматической мембране клетки. Оно основано на следующих данных: а) после обработки поверхности клеток ферментами связывания не происходит [17а]; б) высокоочищенные плазматические мембраны связываются с гормонами; в) гормоны, присоединенные к нерастворимому матриксу, обладают биологической активностью; г) рецепторы гормонов солюбилизируются. Все методы, с помощью которых были получены эти данные, использовались при изучении рецепторов гормона роста.

После инкубации культуры лимфоцитов с трипсином в малых концентрациях связывание $^{125}$I-чГР исчезает, хотя жизнеспособность клеток не изменяется [7]. Таким же действием трипсин обладает и в отношении связывания инсулина [5]. Цушима и сотр. [13] показали, что чГР специфически связывается с осаждающейся при 100 000 g фракцией, выделенной из печени беременных крольчих. Хотя эта фракция содержит 70% общей связывающей активности исходного гомогената и основную часть активности 5′-нуклеотидазы [15], она не настолько полно охарактеризована, чтобы исключить наличие связывающей активности и в каких-то других субклеточных частицах, не попавших в данную фракцию. Это остается справедливым даже для высокоочищенного и хорошо охарактеризованного препарата Невилла [18]. В целях выяснения вопроса о том, проникает ли гормон в клетку для проявления своего биологического действия, некоторые исследователи [19—21] использовали комплекс ГР с сефарозой. Хотя в этих экспериментах действие ГР на ткани проявлялось, никому не удалось доказать, что биологический эффект был результатом действия ГР, связанного с полимером, а не гормона, оторвавшегося от полимера и перешедшего в среду. Из-за технических трудностей, присущих подобным экспериментам [22, 23], наличие биологической активности у комплекса гормон — сефароза в какой бы то ни было системе было поставлено под сомнение [23—25]. В стандартных условиях инкубации (табл. 1) комплексы $^{125}$I-чГР или $^{125}$I-инсулина с рецепторами в культуре лимфоцитов полностью сохраняются, однако при инкубации клеточных культур с высокой плотностью клеток ($2 \times 10^7$ клеток/мл) при 30° С Гавин и сотр. [26] показали, что рецепторы инсулина освобождаются в инкубационную среду по какому-

то неизвестному механизму (возможно, путем «сбрасывания» — общего способа лимфоцитов освобождать поверхностные белки). Мак-Гаффин и др. [27] в нашей лаборатории воспроизвели эти эксперименты с рецепторами чГР в тех же клетках. Когда они инкубировали клетки с высокой плотностью при 30° С и жизнеспособные клетки подвергали воздействию $^{125}$I-чГР, связывание в этих клетках было ниже, чем в контрольных. Так же как в опытах с инсулином, значительная часть связывающей активности обнаруживалась в надосадочной фракции 100 000 *g*.

Все вышеприведенные данные о рецепторах ГР в плазматических мембранах справедливы и для инсулина. Дальнейшие доказательства связывания гормонов плазматическими мембранами были получены в опытах с инсулином, меченным ферритином [28, 29]. С помощью электронной микроскопии удалось показать, что меченный ферритином инсулин локализуется на поверхности плазматических мембран клеток печени [28] и жировой ткани [29].

Таким образом, доказательства того, что биологически важные рецепторы ГР находятся в плазматической мембране, носят косвенный характер, но согласуются с общим положением для полипептидных гормонов.

### Б. Биологическая активность гормонов, меченных иодом

В обычных условиях реакции иодированию подвергается лишь небольшая часть молекул гормона. Поэтому при изучении гормон-рецепторных взаимодействий необходимо показать, что меченые молекулы гормона, которые связываются с рецептором, не отличаются от немеченых.

Для ряда полипептидных гормонов [17, 31] применяют метод ступенчатого иодирования с использованием модифицированного хлораминного метода [30]. С помощью такого способа введения метки были получены два меченых гормона — АКТГ [32] и инсулин [33]. Показано, что меченый гормон, полностью отделенный от немеченого, сохраняет биологическую активность. Мы не отделяли меченый ГР от немеченого, но мы иодировали чГР стабильным изотопом иода путем ступенчатого добавления хлорамина Т при отношении гормона к иоду 1 : 1 и показали, что $^{125}$I-чГР не отличается от нативного чГР в реакции конкурентного связывания в культуре лимфоцитов (неопубликованные данные).

### В. Взаимоотношение связывающих мест и активации клеток

Если биологически активный иодированный гормон связывается с рецептором, расположенным в плазматической мембране клетки, то должны существовать дополнительные механизмы, обеспе-

чивающие внутриклеточные эффекты гормона. В определенных случаях, когда в качестве вторичного посредника действует цАМФ, можно сделать несколько обобщений. Хотя неизвестно, каким путем связывание с тканями-мишенями АКТГ [32], глюкагона [34] или ЛГ [35] приводит к активации аденилатциклазы, ясно, что эти гормоны в небольших физиологических концентрациях, в которых они конкурируют за связывание с рецептором, быстро активируют ферментативное образование цАМФ. Концентрации, в которых гормоны оказывают этот эффект, коррелируют с физиологическим уровнем гормонов у животных и человека. Даже в случае инсулина, внутриклеточные медиаторы которого неизвестны, концентрации гормона, необходимые для осуществления большинства биологических эффектов in vitro, находятся в пределах физиологических концентраций инсулина in vivo [36].

В настоящее время из-за отсутствия достаточной информации мы только строим догадки о возможных взаимоотношениях между связыванием ГР и его биологическим действием и о существовании внутриклеточных медиаторов действия ГР. Вопрос еще больше осложняется тем, что мы не знаем, какие ткани являются мишенями для ГР [37, 38]. При исследовании действия ГР на отдельные ткани было показано, что ГР активирует липолиз в жировой ткани in vitro, но, за исключением особых случаев [40], эффект проявляется после длительной задержки [39] и, как правило, в присутствии относительно высоких концентраций гормона. ГР стимулирует транспорт аминокислот и глюкозы в препаратах мышечной ткани in vitro, но тоже лишь в очень высоких концентрациях [37]. При исследовании in vivo вопрос снова осложняется из-за высоких концентраций гормона, необходимых для проявления любого действия ГР; лишь некоторые эффекты можно наблюдать при использовании концентраций, характерных для эндогенной, то усиливающейся, то ослабевающей секреции ГР [38]. В дополнение к этому многие эффекты in vivo парадоксальны по отношению к эффектам in vitro. Например, in vitro ГР подобно инсулину стимулирует транспорт глюкозы, но в условиях in vivo его действие антагонистично действию инсулина [41], и у больных акромегалией наблюдается только этот антагонистический эффект. Изучение действия ГР in vivo еще более осложняется трудностью разграничения первичных и вторичных эффектов. Лучше всего это иллюстрируется на примере стандартного метода определения биологической активности гормона на крысах, где при тестировании по увеличению веса тела требуется 10—250 мкг ГР в день, а при тестировании по увеличению ширины тибиального хряща 15—400 мкг ГР в день [37]. Рост скелета стимулируется группой зависимых от ГР пептидов, известных под названием соматомединов [42, 43]. Эти пептиды а) вызывают резкие изменения метаболизма в хрящах in vitro (сам же ГР in vitro этих изменений не вызывает) [44]; б) стимулируются ГР

in vivo [45] и в) содержатся в небольших количествах при недостаточности ГР и в больших количествах при акромегалии [46]. Предполагают, что другой родственный им пептид НИПА (неподавляемая инсулиноподобная активность, растворимая в кислом этаноле) зависит от ГР и отвечает за острые инсулиноподобные эффекты, наблюдаемые при введении ГР in vivo [47], тогда как сам ГР оказывает эти эффекты в условиях in vitro [37]. Из этого обсуждения и обзора литературы [37, 38, 48] ясно, что невозможно выдвинуть единую гипотезу, которая объясняла бы различные эффекты ГР, наблюдаемые in vivo и in vitro у грызунов и человека. Если тем не менее мы отбросим некоторые прямые эффекты ГР на ткани грызунов и припишем их фармакологическому действию гормона [48], то можно сделать некоторые предварительные заключения.

Основным эффектом ГР у человека является стимуляция освобождения инсулиноподобных пептидов, например соматомединов, НИПА и, возможно, некоторых других. В скелетной мышце имеются специфические рецепторы этих пептидов, которые служат посредниками при осуществлении ростового эффекта, причем их специфичность частично перекрывается со специфичностью рецепторов инсулина, в результате чего пептиды оказывают инсулиноподобное анаболическое действие. Специфические рецепторы соматомедина [46, 49] и НИПА [50] обнаружены в ряде тканей. Рассматриваемые пептиды конкурируют с инсулином за связывающие места пропорционально их инсулиноподобной активности in vitro, а динамика освобождения НИПА [47, 51] при внутривенном введении чГР соответствует проявлению инсулиноподобного эффекта ГР в относительно низких концентрациях [52]. Помимо стимуляции освобождения инсулиноподобных пептидов, к первичным эффектам ГР относится стимуляция липолиза, антагонистическое действие по отношению к инсулину и увеличение секреции инсулина, т. е. эффекты, которые можно назвать антиинсулиновыми.

Если соматомедины продуцируются в печени [53] или в других тканях [45], то непонятно, зачем для стимуляции их секреции нужны такие большие концентрации ГР; концентрации ГР, при которых его связывание с мембранами печени протекает дозозависимо [13, 14], гораздо лучше коррелируют с концентрациями ГР в крови у человека [38]. ГР стимулирует рост лимфоидной ткани [54] и оказывает действие на лейкозные лимфоциты [55] и тимоциты [54, 56], но его действие не проявляется в культурах лимфоцитов, которые мы исследовали. Хотя концентрации ГР, при которых он в зависимости от дозы связывается с лимфоцитами и мембранами печени, хорошо коррелируют с физиологическими концентрациями циркулирующего ГР, взаимоотношения между связыванием ГР и его биологическим действием остаются загадкой.

## V. ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ СВЯЗЫВАНИЯ ГОРМОНА РОСТА

### А. Радиорецепторный метод

Полученные в экспериментах данные указывают на то, что ГР связывается с рецепторами на поверхности клеток по принципу биологического «узнавания», и мы можем использовать это явление для биоиспытаний, даже не зная механизма действия ГР [3, 57—59]. Чувствительную и специфичную систему связывания применяют для определения активности компонентов ГР в плазме крови и в экстрактах гипофиза человека [2, 57, 60], для тестирования ГР-подобных веществ [61, 62] и для выяснения вопроса о том, как ГР регулирует свои собственные рецепторы [63].

Многими исследователями было показано, что некоторые, а возможно, и все полипептидные гормоны как в крови, так и в продуцирующей их железе существуют более чем в одной форме. Для определения различных компонентов гормонов используют радиоиммунологический метод в комбинации с гель-фильтрацией [64]. В экстракте гипофиза и в плазме крови чГР существует в трех или более формах [60]. Формы чГР различаются по поведению при гель-фильтрации. После пропускания через колонку с сефадексом плазмы крови или экстрактов гипофиза образуются три или большее число пиков [64]: «малый» пик чГР соответствует материалу с мол. весом ~22 000, «большой» пик чГР — мол. весу ~40 000 и пик, предшествующий большому, элюируется в свободном объеме колонки или сразу после него. Мы тщательно исследовали две формы чГР — «большой» чГР и «малый» чГР — с помощью радиоиммунологического метода и радиорецепторного метода в культуре лимфоцитов [2]. Обе формы чГР обнаруживаются в плазме крови здоровых людей и больных акромегалией, так же как в экстрактах нормальных гипофизов и гипофизарных опухолей. У здоровых людей содержание «большого» чГР (24—37%) выше, чем у больных акромегалией (6—14%) [2, 64а].

Для установления соотношения радиорецепторной и радиоиммунологической активности элюатов, полученных после гель-фильтрации через сефадекс, фракции, содержавшие «малый» и «большой» чГР, сливали отдельно и концентрировали лиофилизацией. Активность «малого» чГР при испытании радиорецепторным методом в культуре лимфоцитов и радиоиммунологическим методом была приблизительно одинаковой. Однако, когда таким же образом исследовали фракции «большого» чГР, активность материала при испытании радиорецепторным методом составляла 20% его радиоиммунологической активности. Эта небольшая активность, по-видимому, обусловлена превращением «большой» формы ГР в «малую» во время хранения.

При тестировании в системе мембран печени беременных крольчих Херингтон и сотр. [65] обнаружили, что радиорецепторная ак-

тивность разбавленной нефракционированной плазмы крови была ниже ее радиоиммунологической активности, а после гель-фильтрации плазмы показали, что пониженной активностью обладал «большой» компонент. Используя ту же радиорецепторную систему, Цушима и др. [14] обнаружили в единственной пробе фракционированной плазмы крови увеличенную радиорецепторную активность по сравнению с радиоиммунологической, а по данным Гайда и Уайта [66], активность «большого» и «малого» чГР при определении радиоиммунологическим и радиорецепторным методами была практически одинаковой. Такие расхождения результатов при испытаниях на мембранах печени недавно обсуждались в литературе, но разъяснения пока не получили.

При испытании в культуре лимфоцитов радиорецепторная активность «большого» пика ГР как в гипофизарном экстракте, так и в плазме крови была пониженной. По данным гель-фильтрации содержание «большого» ГР в неочищенных гипофизарных экстрактах выше, чем в большинстве очищенных препаратов чГР (рис. 4) [2, 60]. Этим, возможно, объясняется расхождение результатов радиорецепторного и радиоиммунологического испытаний частично очищенных препаратов ГР [7] (см. выше).

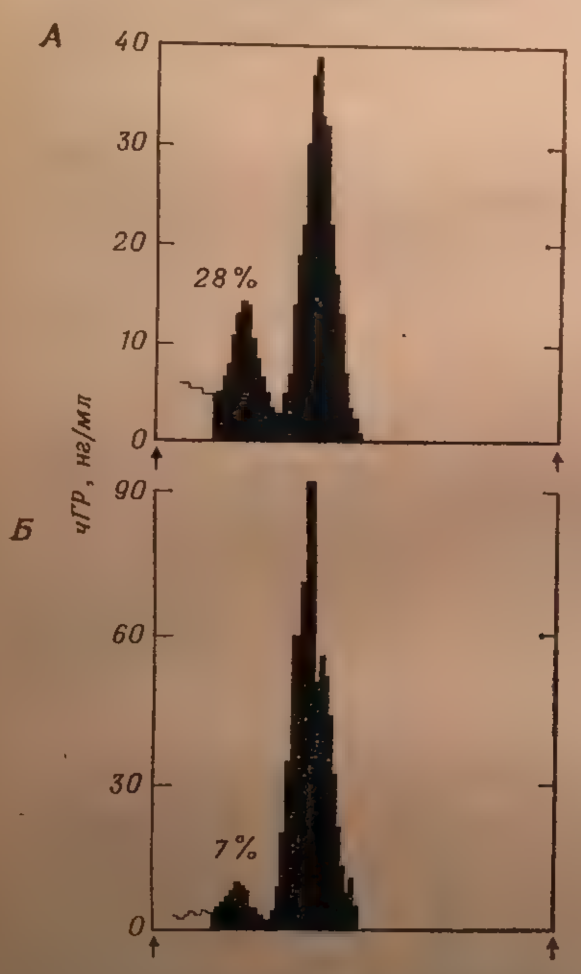



**Рис. 4.** Гель-фильтрация на сефадексе G-100 гипофизарных экстрактов чГР. *А*. Гель-фильтрация неочищенного экстракта, выделенного из одного гипофиза. *Б*. Гель-фильтрация препарата чГР иммунохимической чистоты [60]. Концентрация чГР в каждой фракции была определена радиоиммунологическим методом.

Данные исследования показывают, что в плазме и гипофизе присутствуют компоненты гетерогенного ГР со сходной иммунологической активностью, но различной радиорецепторной и предположительно биологической активностями. Указанные методы определения этих активностей в дополнение к определению общей иммунологической активности ГР плазмы крови можно использовать при тех патологических состояниях, когда предполагают изменение активности ГР. Кроме того, разработанные радиоиммунологический метод для соматомедина В [67] и радиорецепторный метод для соматомединов [46, 49] и НИПА [50, 51, 68] позволяют непосредственно

измерять активность и ГР, и известных медиаторов действия ГР.

В культуре лимфоцитов тестируют только препараты ГР человека, в то время как метод тестирования на мембранах печени беременных крольчих применим и для животных, не относящихся к приматам. С помощью радиорецепторного метода на мембранах печени Цушима и сотр. [61] идентифицировали в сыворотке беременных обезьян ГР-подобное вещество, отличное от плацентарного лактогена и не определяемое радиоиммунологическим методом. Плеврацероидные личинки (спаргана ленточного червя *Spirometra mansonoides*) секретируют фактор, стимулирующий рост гипофизэктомированных крыс [69]. В среде, полученной после инкубации этих червей, как и в сыворотке зараженных ими крыс, обнаруживается ГР-подобная активность, определяемая радиорецепторным методом [62].

Радиорецепторный метод успешно применяется для исследования препаратов гипофиза на различных стадиях очистки [7, 14] и для изучения структурно-функциональных взаимоотношений. Ауберт и сотр. [70] изучали конформацию молекулы чГР и сравнивали конформационные изменения производных чГР с изменением их рецепторной, иммунологической и биологической активностей. Скайлер и сотр. [71] использовали радиорецепторную активность как один из параметров для характеристики ГР, продуцируемого культурой опухоли гипофиза человека. Различий между ГР опухолевой и нормальной ткани гипофиза при этом не обнаружено.

### Б. Регуляция рецепторов гормоном

Хотя in vivo ГР и инсулин действуют как антагонисты, инсулин не оказывает регулирующего действия на рецепторы ГР, так же как ГР на рецепторы инсулина. На основании ряда экспериментов, выполненных на грызунах и при обследовании людей, а также в культуре лимфоцитов in vitro, предполагают, что инсулин регулирует концентрацию собственных рецепторов. Так, при хроническом избытке инсулина in vivo [72, 73] или in vitro [74] происходит снижение числа рецепторов и чувствительности к гормону, а понижение концентрации инсулина коррелирует с увеличением числа рецепторов и повышением чувствительности к гормону. Как уже подробно обсуждалось [74], такие регуляторные изменения следует отличать от изменений за счет физической занятости рецепторов.

Если чГР в такой низкой концентрации, как 5 нг/мл, при которой в равновесном состоянии он связывает только 10% рецепторов, инкубировать с культурой лимфоцитов в течение 24 ч, то происходит потеря рецепторов на 50%, а в присутствии 20 нг/мл чГР и 50%-ной занятости рецепторов наблюдается потеря рецепторов на 85%. Удаление гормона из среды приводит к восстановлению числа рецепторов, причем это восстановление может быть подавлено ингибиторами белкового синтеза [63]. (Опять-таки подобные регу-

ляторные изменения, зависящие от времени и концентрации, отличаются от изменений, обусловленных занятостью рецепторов [10].)

На основании изложенных работ предполагают, что взаимное влияние концентрации гормона и концентрации рецепторов на биологический ответ осуществляется за счет прямой модуляции на клеточном уровне и от него в большой степени зависит чувствительность клетки-мишени. Эти данные уже использовались при изучении состояния резистентности к инсулину у человека [72].

Гудмэн [37] подчеркивает трудность воспроизведения биологических эффектов in vitro на тканях негипофизэктомированных крыс; стоит подумать о том, не вовлечена ли в процесс взаимодействия гормона с рецептором в ткани регуляция числа рецепторов циркулирующим гормоном. До сих пор не удается идентифицировать рецепторы ГР в мононуклеарных клетках человека, как это было сделано для инсулина [75].

Наконец, следует сказать, что почти ничего неизвестно о химической природе, составе или структуре рецепторов ГР. Мак-Гаффин и сотр. [27] получили солюбилизированный рецептор ГР из культуры лимфоцитов без помощи детергента. Такой подход, возможно, будет способствовать выяснению химической природы рецептора. Ясно, что дальнейшее изучение химических и физических свойств рецептора, взаимоотношений между связыванием гормона и активностью, так же как и обнаружение рецепторов в периферических тканях человека, остаются важными проблемами будущих исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. *Roth J.*, Metabolism, *22*, 1059 (1973).
2. *Gorden P., Lesniak M. A., Hendricks C. M., Roth J.*, Science, *182*, 829 (1973).
3. *Gorden P., Gavin J. R., III, Kahn C. R., Archer J. A., Lesniak M. A., Hendricks C. M., Neville D. M., Jr., Roth J.*, Pharmacol, Rev., *25*, 179 (1973).
4. *Gavin J. R., III, Roth J., Jen P., Freychet P.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 747 (1972).
5. *Gavin J. R., III, Gorden P., Roth J., Archer J. A., Buell D. N.*, J. Biol. Chem., *248*, 2202 (1973).
6. *Lesniak M. A., Roth J., Gorden P., Gavin J. R., III*, Nature [New Biol.], *241*, 20 (1973).
7. *Lesniak M. A., Gorden P., Roth J., Gavin J. R., III*, J. Biol. Chem., *249*, 1661 (1974).
8. *Marx S. J., Aurbach L. D., Lavin J. R., III, Buell D. N.*, J. Biol. Chem., *249*, 6812 (1974).
9. *Gavin J. R., III, Buell D. N.* (submitted for publication).
10. *De Meyts P.*, in: Methods in Receptor Research (M. Blecher, ed.), Methods in Molecular Biology series (A. I. Laskin and J. A. Last, eds.), M. Dekker, New York, 1975.
11. *Berson S. A., Yalow R. S.*, J. Clin. Invest., *38*, 1996 (1959).
12. *De Meyts P., Roth J., Neville D. M., Jr., Gavin J. R., III, Lesniak M. A.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *55*, 154 (1973).
13. *Tsushima T., Friesen H. G.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *37*, 334 (1973).
14. *Tsushima T., Shiu R. P. C., Kelly P. A., Friesen H. G.*, in: Advances in Human Growth Hormone Research (S. Raiti, ed.), DHEW Publication No. (NIH) 74—612, Washington, D. C., 1974, pp. 372—393.

15. *Posner B. I., Kelly P. A., Shiu R. P. C., Friesen H. G.*, Endocrinology, *95*, 521 (1974).
16. *Kelly P. A., Posner B. I., Tsushima T., Shiu R. P. C., Friesen H. G.*, in: Advances in Human Growth Hormone Research (S. Raiti, ed.), DHEW Publication No. (NIH) 74—612, Washington, D. C., 1974, pp. 567—687.
17. *Arrenbrecht S.*, Nature, *252*, 255 (1974).
17a. *Pastan I., Roth J., Macchia V.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *56*, 1802 (1966).
18. *Kahn C. R.*, in: Methods in Membrane Biology, Vol. 3 (E. D. Korn, ed.), Plenum Press, New York, 1975.
19. *Fellows R. E., Klingensmith G. J., Williams E. M., III*, Endocrinology, *92*, 431 (1973).
20. *Schwartz J., Nutting D. F., Goodman H. M., Kostyo J. L., Fellows R. E.*, Endocrinology, *92*, 439 (1973).
21. *Postel-Vinay M.-C., Swislocki N. I., Sonenberg M.*, Endocrinology, *95*, 1554 (1974).
22. *Cuatrecasas P.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *63*, 450 (1969).
23. *Katzen H. M., Vlahakes G. J.*, Science, *179*, 1142 (1973).
24. *Davidson M. B., van Herle A. J., Gerschenson L. C.*, Endocrinology, *92*, 1442 (1973).
25. *Kolb H. J., Renner R., Hepp Dieter K., Weiss L., Wieland O. H.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *72*, 248 (1975).
26. *Gavin J. R., III, Buell D. N., Roth J.*, Science, *178*, 168 (1972).
27. *McGuffin W. L., Jr., Gavin J. R., III, Lesniak M. A., Gorden P., Roth J.*, Endocrinology (в печати).
28. *Orci L., Rufener C., Malaisse-Lagre F., Blondel B., Amherdt M., Bataille D., Freychet P., Perrelet A.*, Israel J. Med. Sci., *11*, 639 (1975).
29. *Jarett L., Smith R. M.*, J. Biol. Chem., *249*, 7024 (1974).
30. *Hunter W. M., Greenwood F. C.*, Nature, *194*, 495 (1962).
31. *Roth J.*, Methods Enzymol., *37*, 223—233 (1975).
32. *Lefkowitz R. J., Roth J., Pricer W., Pastan I.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *65*, 745 (1970).
33. *Freychet P., Roth J., Neville D. M., Jr.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *43*, 400 (1971).
34. *Rodbell M., Krans H. M. J., Pohl S. L., Birnbaumer L.*, J. Biol. Chem., *246*, 1861 (1971).
35. *Catt K. J., Dufau M. L., Tsuruhara T.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *32*, 860 (1971).
36. *Freychet P., Roth J., Neville D. M., Jr.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *68*, 1833 (1971).
37. For a list of pertinent references see Chap. 2, Part II, in: Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology, Vol. 2A (S. A. Berson and R. S. Yalow, eds.), American Elsevier, New York, 1973, pp. 257—329.
38. For a list of pertinent references see W. H. Daughaday, in: Textbook of Endocrinology (R. H. Williams, ed.), Saunders, Philadelphia, Pa., 1974, pp. 31—79.
39. *Fain J. N., Kovacev V. P., Scow R. O.*, J. Biol. Chem., *240*, 3522 (1965).
40. *Ramachandran J., Lee V., Li C. H.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *48*, 274 (1972).
41. *Rabinowitz D., Zierler K. L.*, J. Clin. Invest., *42*, 967 (1963).
42. *Daughaday W. H., Hall K., Raben M. S., Salmon W. D., Jr., van der Brande J. L., van Wyk J. J.*, Nature, *235*, 107 (1972).
43. *Van Wyk J. J., Underwood L. E., Kintz R. L., Voina S. J., Weaver R. P.*, Recent Prog. Horm. Res., *30*, 259 (1974).
44. *Salmon W. D., Jr., Daughaday W. H.*, J. Lab. Clin. Med., *49*, 825 (1957).
45. *Hall K.*, Acta Endocrinol. (Kbh.), *66*, 491 (1971).
46. *Marshall R. N., Underwood L. E., Voina S. J., Foushee D. B., van Wyk J. J.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *39*, 283 (1974).
47. *Megyesi K., Kahn C. R., Roth J., Gorden P.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *41*, 475 (1975).

48. *Rabinowitz D., Merimee T. J.*, Israel J. Med. Sci., *9*, 1599 (1973).
49. *Hall K., Takano K., Fryklund L.*, Metabolism, *39*, 973 (1974).
50. *Megyesi K., Kahn C. R., Roth J., Froesch E. R., Humbel R. E., Zapf J., Neville D. M., Jr.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *57*, 307 (1974).
51. *Megyesi K., Kahn C. R., Roth J., Gorden P.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *38*, 931 (1974).
52. *Fineberg S. E., Merimee T. J.*, Diabetes, *23*, 499 (1974).
53. *McConaghy P., Sledge C. B.*, Nature, *225*, 1249 (1970).
54. *Whitfield J. F., Perris A. D., Youdale T.*, J. Cell Physiol., *73*, 203 (1969).
55. *Desai L. S., Lazarus H., Li C. H., Foley G. E.*, Exp. Cell Res., *81*, 330 (1973).
56. *Pandian M. R., Talwar G. P.*, J. Exp. Med., *134*, 1095 (1971).
57. *Gorden P., Lesniak M. A., Hendricks C. M., Roth J., McGuffin W. L., Jr., Gavin J. R., III*, in: Advances in Human Growth Hormone Research (S. Raiti, ed.), DHEW Publication No. (NIH) 74-612, Washington, D. C., 1974, pp. 545—566.
58. *Roth J.*, Methods Enzymol., *37*, 66—81 (1975).
59. *Roth J., Kahn C. R., Lesniak M. A., Gorden P., de Meyts P., Megyesi K., Neville D. M., Jr., Gavin J. R., III, Soll A. H., Freychet P., Goldfine I. D., Bar R. S., Archer J. A.*, Recent Prog. Horm. Res., *31* (1975).
60. *Gorden P., Lesniak M. A., Hendricks C. M., Roth J., McGuffin W. L., Jr., Gavin J. R., III*, Israel J. Med. Sci., *10*, 1239 (1974).
61. *Tsushima T., Peeters S., Myers R. E., Friesen H. G.*, Endocrinology, *92*, Supp. A—176 (1973).
62. *Tsushima T., Friesen H. G., Chang T. W., Raben M. S.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *59*, 1062 (1974).
63. *Lesniak M. A., Bianco A. R., Roth J., Gavin J. R., III*, Clin. Res., *22*, 343A (1974).
64. For a list of pertinent reference see Part IV, in: Advances in Human Growth Hormone Research (S. Raiti, ed.), DHEW Publication No. (NIH) 74-612, Washington, D. C., 1973, pp. 483—608.
64a. *Gorden P., Lesniak M. A., Eastman R., Hendricks C. M., Roth J.*, J. Clin. Endocrinol Metab. (в печати).
65. *Herington A. C., Jacobs L. S., Daughaday W. H.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *39*, 257 (1974).
66. *Guyda H., Whyte S.*, Endocrinology, Supp., *94*, A—133 (1974).
67. *Yalow R. S., Hall K., Luft R.*, J. Clin. Invest., *55*, 127 (1975).
68. *Megyesi K., Kahn C. R., Neville D. M., Jr., Nissley S. P., Humbel R. E., Froesch E. R.* (в печати).
69. *Mueller J. F.*, J. Parasitol., *54*, 795 (1968).
70. *Aubert M. L., Bewley T. A., Grumbach M. M., Kaplan S. L.*, in: Advances in Human Growth Hormone Research (S. Raiti, ed.), DHEW Publication No. (NIH) 74—612 ,Washington, D. C., 1974, pp. 434—466.
71. *Skyler J. S., Knazek R. A., Rogol A. D., Lovenberg W.*, Clin. Res., *23*, 423A (1975).
72. *Archer J. A., Gorden P., Roth J.*, J. Clin. Invest., *55*, 166 (1975).
73. *Soll A. H., Kahn C. R., Neville D. M., Jr., Roth J.*, J. Clin. Invest., *56*, 769 (1975).
74. *Gavin J. R., III, Roth J., Neville D. M., Jr., de Meyts P., Buell D. N.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *71*, 84 (1974).
75. *Schwartz R. H., Bianco A. R., Handwerger B. J., Kahn C. R.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *72*, 474 (1975).

# Глава 10

# РЕЦЕПТОРЫ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ

*М. ЛИПМАН*

Medicine Branch
National Cancer Institute
Bethesda, Maryland

## I. ВВЕДЕНИЕ

За последние десять лет накоплено много важных фактов, касающихся механизма действия глюкокортикоидов. В настоящее время становится очевидным, что первоначальным этапом реализации большинства эффектов стероидных гормонов является взаимодействие стероида с цитоплазматическими белками. Однако вопрос о том, можно ли все разнообразие эффектов глюкокортикоидов в разных тканях свести к одному универсальному механизму, остается открытым. В этой главе будут рассмотрены данные, свидетельствующие о первичной роли рецепторных белков в действии глюкокортикоидных гормонов. Другие аспекты взаимодействия стероидов с клетками достаточно полно отражены в недавно вышедших обзорах [1—4]. Мы не ставили своей целью перечислить все накопленные факты о влиянии глюкокортикоидов на индукцию ферментов и на физиологию клетки. Напротив, наше внимание будет обращено главным образом на рецепторные белки и на то, как наилучшим образом связать результаты исследования рецепторов с действием глюкокортикоидов на ткани-мишени. Аналогичные сведения о рецепторах других стероидных гормонов будут представлены в специальных разделах этой книги.

К сожалению, по сравнению с рецепторными белками стероидов других классов рецепторы глюкокортикоидов охарактеризованы, пожалуй, наименее полно. Это обусловлено многими причинами. Во-первых, экстракты многих тканей содержат значительные количества примесей крови, включая кортикостероидсвязывающий глобулин (КСГ). Присутствие этого α-глобулина плазмы, обладающего высоким сродством ко многим глюкокортикоидам, затруднило анализ результатов многих ранних работ. Прежде всего это относится к исследованиям, выполненным на печени, где выявлено и идентифицировано пять компонентов, связывающих гормон. Во-вторых, некоторые ткани способны быстро метаболизировать кор-

тикоиды до неактивных соединений [5], которые впоследствии могут связываться цитоплазматическими белковыми компонентами, отличными от рецепторов [6, 7]. Так, Фиала и Литуок [8] показали, что после инъекции меченого кортизола в условиях максимального накопления этого гормона в печени лишь 6% радиоактивности приходится на неметаболизированный кортизол. В-третьих, глюкокортикоиды связываются многими компонентами клетки, содержащими липофильные мембранные фракции, в том числе митохондриями и лизосомами. Сродство гормонов к таким компонентам бывает различным, но чаще всего оно оказывается ниже сродства к рецепторам. Хотя такое связывание и называют обычно «неспецифическим», в настоящее время нет достаточных оснований отрицать возможную роль некоторых из этих «неспецифических» мест связывания как медиаторов, по крайней мере некоторых из известных эффектов глюкокортикоидов. Бо́льшая часть «дорецепторных» исследований десятилетие назад касалась взаимодействий именно такого типа [9]. В частности, было описано действие глюкокортикоидов на изолированные ферментные системы, стабилизацию лизосом, структуру эндоплазматической сети [2, 9]. К главным недостаткам работ подобного рода следует отнести прежде всего отсутствие соответствующей стероидной специфичности и тот факт, что для получения эффекта необходимо использовать сверхфармакологические концентрации гормонов. Несмотря на такие оговорки, в настоящее время нельзя полностью исключить важную роль таких «неспецифических» мест связывания (например, в случае применения массированных доз кортизола при лечении шока, вызванного грамотрицательными микроорганизмами). Однако почти не вызывает сомнений, что большинство гормональных эффектов опосредуется глюкокортикоидными рецепторами. Выявление небольшого количества мест связывания с высоким сродством к гормону (на клетку обычно приходится лишь несколько тысяч таких мест) среди огромного количества мест связывания с низким сродством к стероиду (обнаруженных в большинстве тканей и составляющих популяцию, практически ненасыщаемую гормоном) представляло собой чрезвычайно сложную в методологическом плане задачу. И наконец, последняя проблема, с которой сталкивались при анализе экспериментальных данных, связана с использованием в различных исследованиях целого ряда радиоактивных и немеченых глюкокортикоидов, различающихся по сродству к рецепторам и белкам плазмы, по физиологическим эффектам и по продуктам метаболизма. Пожалуй, наиболее сложные вопросы возникали в силу того, что некоторые синтетические глюкокортикоиды обладают более высоким сродством к отдельным белковым компонентам, чем основные природные глюкокортикоидные гормоны млекопитающих — кортизол и кортикостерон, — и имеют иную специфичность сродства. Так, кортизол обладает примерно одинаковым сродством к КСГ и к цитоплазматическим рецептор-

ным белкам, тогда как дексаметазон связывается исключительно рецепторами цитоплазмы [10].

Несмотря на все вышеперечисленные трудности, накопленные к настоящему времени сведения о свойствах рецепторных молекул дают достаточные основания считать их медиаторами большинства эффектов стероидных гормонов. Доказательства медиаторной роли рецепторов получены

1) при исследовании их локализации в разных тканях и изучении динамики развития рецепторного аппарата в онтогенезе;

2) при сопоставлении данных о сродстве рецепторов к различным стероидам и специфичности связывания этих гормонов с их активностью;

3) при исследовании изменений свойств рецепторов под влиянием температуры, солей и стероидов — в особенности тех свойств, которые определяют способность рецепторных белков захватываться и связываться компонентами ядер или хроматина;

4) при изучении гибридов соматических клеток и различных нечувствительных к стероидам популяций клеток — направление, получившее распространение в самое последнее время.

В последующих разделах мы кратко рассмотрим каждый из этих подходов для того, чтобы выяснить значение тех свойств рецепторов, которые существенны для действия глюкокортикоидов. Хотя в изучении свойств рецепторных белков уже достигнут значительный прогресс и соответствующие данные будут нами представлены, попытки выделения этих белков в чистом виде до сих пор не увенчались успехом. Это в значительной мере обусловлено чрезвычайно высокой лабильностью рецепторов глюкокортикоидов даже по сравнению с рецепторами стероидов других классов. Кроме того, значительными препятствиями при очистке рецепторных молекул являются их низкая концентрация в тканях-мишенях, тенденция к агрегации, существование других стероидсвязывающих компонентов, с которыми легко спутать рецепторы. Полученные к настоящему времени результаты исследований по очистке рецепторов глюкокортикоидных гормонов будут приведены ниже.

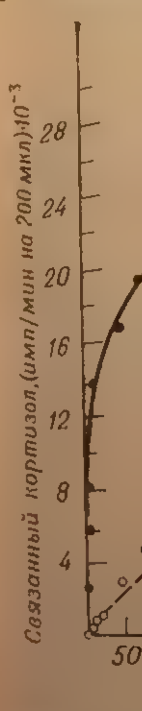
## II. МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ РЕЦЕПТОРОВ

Методы измерения количества глюкокортикоидных рецепторов в целом аналогичны методам, используемым для определения рецепторов стероидных гормонов других классов. Все зависит от эффективности способа дифференцированного измерения фракций несвязанного гормона, гормона, связанного неспецифическими местами связывания, и гормона, связанного с местами, обладающими высоким сродством. Прежде чем рассматривать каждый из этих методов детально, уместно напомнить, что, за исключением, быть может, случая равновесного диализа, проводимого с очищенным стабильным препаратом рецептора, всем методам присущи

определенные недостатки. К наиболее серьезным недостаткам относятся: диссоциация комплексов рецептора со стероидом в процессе разделения белковосвязанного и свободного гормона; адсорбция рецептора на материале, используемом для разделения; недостаточно четкое разделение стероида, связанного специфически и неспецифически. Математический аппарат для анализа результатов, полученных самыми разными методами, является универсальным, его основы подробно изложены в ряде работ [11, 12].

В ранних исследованиях по действию глюкокортикоидов на печень было показано, что в первоначальный момент основная масса связанного гормона приходится на долю цитоплазматической фракции [13—15]. После нескольких неудачных попыток [16, 17] многим исследователям удалось выявить наличие практически во всех тканях-мишенях молекул, отвечающих критериям рецепторов глюкокортикоидов [4]. Критерии рецепторов: высокое сродство к глюкокортикоидам, коррелирующее с концентрациями гормона, вызывающими биологический эффект; ограниченная связывающая емкость (насыщаемость); специфичность для стероидных гормонов, выполняющих определенную биологическую функцию, причем необязательно, чтобы фенотипически эти гормоны действовали как индукторы. В большинстве таких работ единственным способом выделения рецепторов было дифференциальное центрифугирование. Мы не будем здесь приводить все те результаты, которые были получены с помощью данного метода определения рецепторов; будут упомянуты лишь работы, важные с точки зрения методологии.

Использовать активированный древесный уголь для удаления несвязанного стероида предлагалось и ранее [18], однако удачный вариант метода выявления рецепторов глюкокортикоидов с помощью отмытого активированного угля впервые удалось разработать лишь Бакстеру и Томкинсу [19]. Впоследствии эти авторы строго обосновали предложенный ими метод [20]. Хотя вначале считалось, что древесный уголь можно использовать для адсорбирования только несвязанного стероида, данный метод можно модифицировать для удаления стероида из комплексов с неспецифически связывающими местами [21, 22]. Подобный подход очень удобен для определения константы диссоциации $K_d$, а также констант скоростей ассоциации и диссоциации. Кроме того, этот метод пригоден для оценки специфичности связывания гормонов рецепторами по результатам конкурентного анализа. Несмотря на попытки предотвратить адсорбцию рецепторных молекул на угле (например, путем покрытия угля декстраном), небольшое количество рецепторного белка все же сорбируется на угле, причем это количество, как правило, нельзя предсказать заранее. Так, при низких концентрациях белка график зависимости связывания гормона рецептором от концентрации белка отклоняется от прямой линии (при этом величины связывания занижаются), и, следова-



тельно, данный метод непригоден в случае исследования небольших образцов ткани. Этот метод требует больших количеств цитозольного белка еще и потому, что полностью удалить цитозоль с поверхности угля после центрифугирования бывает весьма трудно. При использовании данного метода, если не применяется стероид типа дексаметазона, определение количества рецептора затрудняется связыванием гормона транскортином, или кортикостероидсвя-

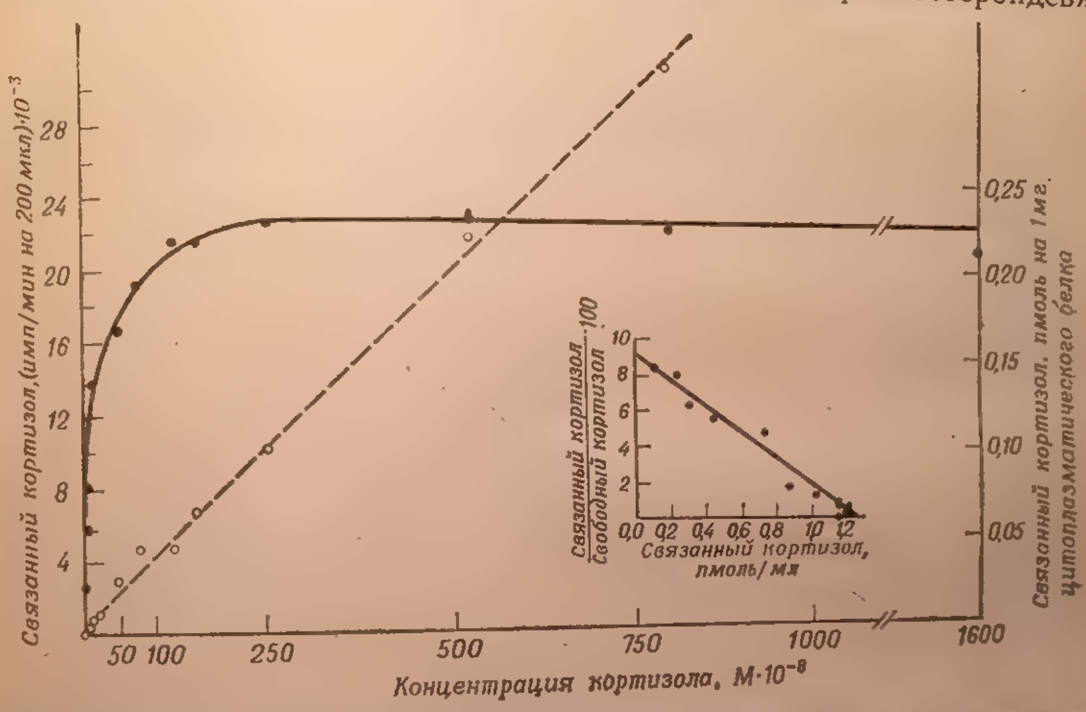



**Рис. 1.** Связывание $^3H$-кортизола рецепторами глюкокортикоидов клеток лимфобластов человека при острой лимфобластной лейкемии. На вставке те же данные представлены в координатах Скэтчарда. Пунктиром обозначено неконкурентное, неспецифическое связывание.

зывающим глобулином (КСГ). На рис. 1 приведена типичная кривая связывания $^3H$-кортизола с рецептором глюкокортикоидов в цитозоле, полученная с использованием для удаления несвязанного стероида активированного угля. На вставке эти результаты представлены в виде графика Скэтчарда. Восходящая пунктирная линия отражает связывание гормона неспецифическими участками, за которые молекулы стероида не конкурируют друг с другом. Таким образом, этот метод дает возможность легко определять насыщаемые участки с высоким сродством в присутствии избытка ненасыщаемых участков.

Другой метод разделения связанного и свободного стероида включает фильтрацию через ДЭАЭ-диски [23]. После нанесения инкубационной смеси на фильтр несвязанный гормон беспрепятственно проходит сквозь фильтры, а стероид-рецепторные комплексы задерживаются. В полученных фракциях определяют содержа-

ние гормона. Стероиды, связанные с неспецифическими белками, также обладают небольшим сродством к таким фильтрам. Наименьшее количество рецепторов, которое можно измерить таким способом, определяется почти исключительно временем счета радиоактивности и удельной радиоактивностью используемого стероида. Воспроизводимость результатов, получаемых этих методом,

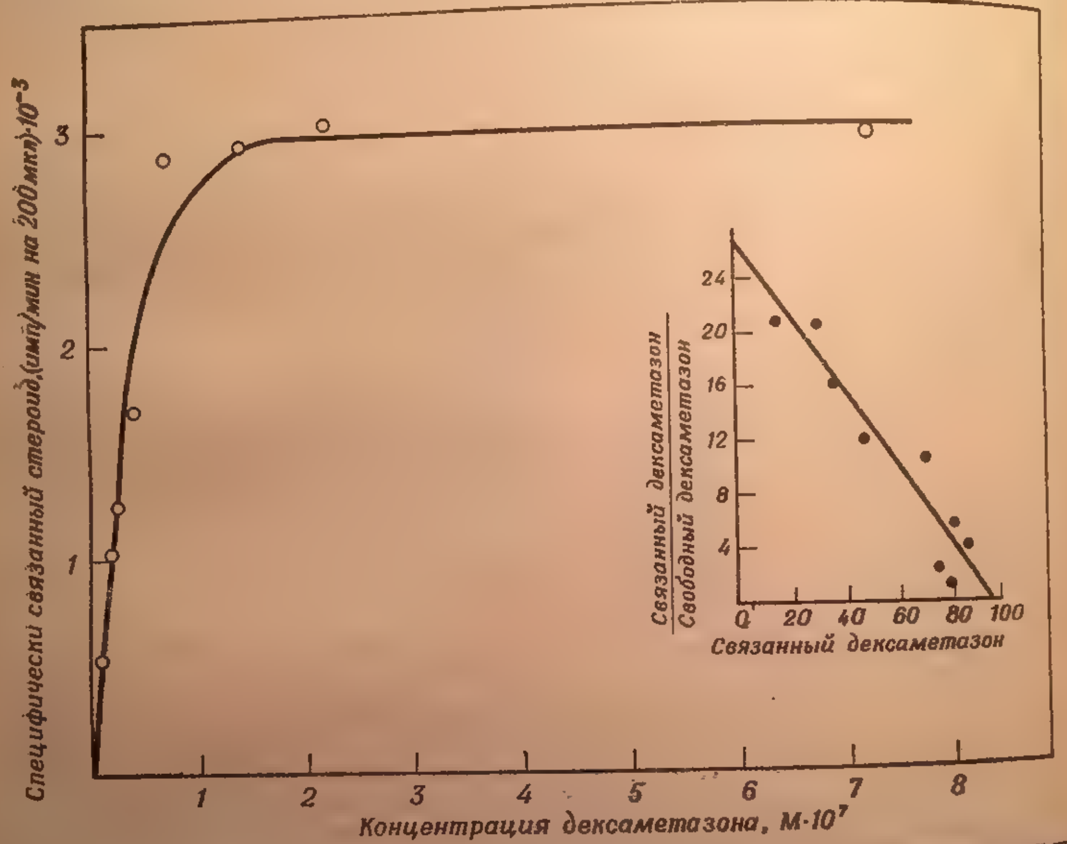



**Рис. 2.** Связывание $^3$H-дексаметазона рецепторами глюкокортикоидов культуры клеток гепатомы. На вставке те же данные представлены в координатах Скэтчарда.

однако, ниже, чем в случае использования метода адсорбции на угле. На рис. 2 приведена типичная кривая связывания $^3$H-дексаметазона цитоплазматическими рецепторами НТС-клеток (культуры ткани гепатомы), полученная при разделении свободного и связанного рецептором стероида на ДЭАЭ-фильтрах. И в этом случае насыщаемые места связывания с высоким сродством выявляются без труда. На вставке те же данные представлены в виде графика Счэтчарда; полученная при этом прямая линия указывает на выявление класса молекул с одинаковым сродством к дексаметазону.

Совсем недавно Фейгельсон и сотр. [24] предложили любопытный метод анализа рецепторов, в котором некоторые проблемы дифференцированного обнаружения рецепторов, по-видимому,

преодолены. Для связывания комплексов стероида с рецептором они использовали суспензию ДНК-целлюлозы. Предложенный метод особенно ценен тем, что для связывания с ДНК-целлюлозой гормон-рецепторные комплексы должны быть активированы с помощью специальной температурной обработки или изменения солевого состава среды (сходные условия необходимы для вхождения стероид-рецепторных комплексов в ядро). Можно думать, что этот метод идеально подходит для отделения нерецепторных связывающих компонентов, таких, как транспортные белки плазмы, которые, по всей видимости, не связываются ДНК-целлюлозой.

Для разделения связанного рецепторами и свободного стероида некоторые исследователи использовали короткие колонки сефадекса [25, 26]. Этот метод, однако, хотя и дает результаты, сравнимые с результатами, получаемыми другими методами, требует значительно больших затрат времени для выполнения большого числа определений. При этом не исключается связывание гормонов с КСГ.

Определенными достоинствами обладает метод центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Измеряя количество вытесняемой немеченым стероидом радиоактивности в определенной области градиента, исследователь может быть вполне уверен, что он определяет радиоактивность именно специфически связанного гормона [27, 28]. Однако для повседневного измерения содержания рецепторов этот способ слишком трудоемок. Использование данного метода для изучения рецепторов ценно тем, что дает возможность определять связывание гормона действительно с рецептором. Для этого измеряют только ту часть способной вытесняться немеченым гормоном радиоактивности, которая мигрирует со специфической для рецептора плавучей плотностью. Более того, применение градиентов с низкой концентрацией соли дает возможность разделять рецепторы, коэффициент седиментации которых равен обычно 6—8 S, и КСГ с коэффициентом седиментации около 4 S. Оргинальный метод для определения рецепторов предложили недавно Ляо и сотр. [29, 30]. Суть его сводится к тому, что после инкубации цитозоля со стероидом в инкубационную смесь добавляют антитела к данному стероиду, присоединенные к сефарозе. При центрифугировании такой смеси и свободный, и связанный с плазматическим транспортным белком стероиды осаждаются вместе со связанными с сефарозой антителами. Таким образом, данный метод позволяет обойти многие затруднения, вызванные присутствием примесей плазматических белков — проблема, с которой часто сталкиваются при измерении рецепторов в опухолях. Предложенный метод, пожалуй, еще более важен в случае определения рецепторных мест связывания дигидротестостерона и эстрадиола, когда нет возможности воспользоваться стероидами, взаимодействующими с рецепторами и не взаимодействующими с глобулином, связывающим половые стероиды (ПССГ).

Такие методы, как использование гидроксилапатита [31] или осаждение гормон-рецепторных комплексов протаминсульфатом [32, 33], не нашли пока применения для анализа рецепторов глюкокортикоидов. В отличие от гидроксилапатита протаминсульфат не взаимодействует к КСГ и ПССГ.

## III. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Чтобы данный белок можно было рассматривать в качестве рецептора при действии глюкокортикоидов, этот белок должен быть обнаружен в тканях-мишенях. Усилиями ряда авторов к настоящему времени собраны сведения о тканевом распределении рецепторов глюкокортикоидных гормонов [2, 4, 27, 34]. Вообще говоря, результаты, полученные в подобных работах, т. е. то, что ткани-мишени содержат ощутимые количества рецепторов, а ткани-«немишени» рецепторов не содержат, можно было предсказать заранее. Показано, например, что интактные лимфоциты циркулирующей крови человека, которые нечувствительны к глюкокортикоидам, практически лишены рецепторов [35]. В то же время после стимуляции фитогемагглютинином рецепторы легко выявляются, причем клетки теперь начинают отвечать на действие глюкокортикоидов ингибированием синтеза макромолекул. Точно так же в чувствительных к стероидам лимфобластах обнаруживаются значительные количества рецепторов глюкокортикоидов, а в клетках, устойчивых к стероидам, содержание рецепторов значительно ниже [35, 36]. На рис. 3 показаны результаты определения содержания рецепторов глюкокортикоидов в различных популяциях клеток лимфоидной ткани человека. В цитозоле лимфобластов больных острой лимфобластической лейкемией, не лечившихся кортикоидами, рецепторы глюкокортикоидов обнаруживаются в ощутимых количествах: 0,12—0,6 пмоль на 1 мг цитозольного белка (принимая, что 1 молекула рецептора связывает 1 молекулу стероида). Нестимулированные фитогемагглютинином лимфоциты здоровых людей, если и содержат рецепторы, то в очень небольших количествах. Рецепторы не обнаруживаются и в лимфобластах больных, которые нечувствительны к лечению глюкокортикоидами. В то же время концентрация рецепторов в лимфобластах больных, лечившихся глюкокортикоидами, но сохранивших чувствительность к этим гормонам, соответствует содержанию рецепторных белков у нелечившихся больных. Подобный анализ рецепторного статуса может, очевидно, найти широкое применение в клинике, поскольку дает возможность, исследуя содержание рецепторов in vitro, предсказать, будут ли лейкемические клетки отвечать на лечение больных глюкокортикоидами [35]. Полученные результаты требуют, однако, дальнейшего изучения. Следует отметить, что аналогичный подход, основанный на исследовании наличия или отсутствия рецепторов эстрогенов, используется для отбора больных раком мо-

лочной железы (см., например, гл. 12). Приводимые ниже примеры позволяют заключить, что в то время как клетки, содержащие рецепторы, могут в отдельных случаях и не отвечать на действие глюкокортикоидов, клетки, лишенные рецепторов, никогда не будут отвечать на гормон (во всяком случае, не будут реализоваться те эффекты, которые опосредуются рецепторами). Пока, однако,

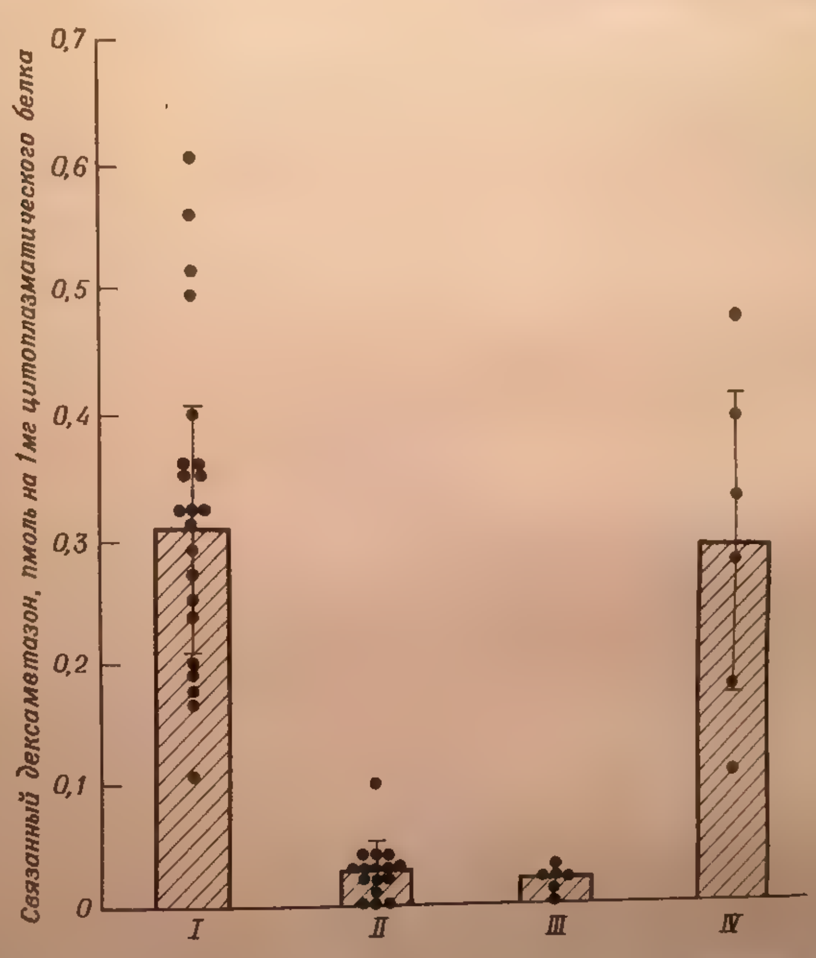



**Рис. 3.** Активность глюкокортикоидных рецепторов в различных популяциях лимфоидных клеток человека. *I* — лимфобласты больных острой лимфобластической анемией, ранее не лечившихся; *II* — нормальные лимфоциты крови человека; *III* — лимфобласты больных, нечувствительных к лечению глюкокортикоидами; *IV* — лимфобласты больных, ранее лечившихся глюкокортикоидами и оставшихся чувствительными к этим гормонам.

не установлено, обусловлено ли исчезновение рецепторной активности действительной потерей рецепторов, или исчезновением связывания в результате структурных модификаций рецепторов, или разрушением рецепторной активности с помощью каких-то, пока не известных механизмов, или же изменением клеточной локализации рецепторов. Приведем примеры некоторых исключений из общего правила. Так, отдельные нечувствительные к глюкокортикоидам клоны злокачественных клеток в культуре ткани содержат

нормальные количества рецепторных белков [37, 38]. Рецепторы резистентных к стероидам лейкемических клеток человека обладают, как показано, совершенно нормальным сродством к сильным глюкокортикоидам. Гормон-рецепторные комплексы таких клеток нормально связываются ядрами клеток-мишеней в бесклеточной системе in vitro. На рис. 4 показано, что связывание $^3$Н-дексаме-

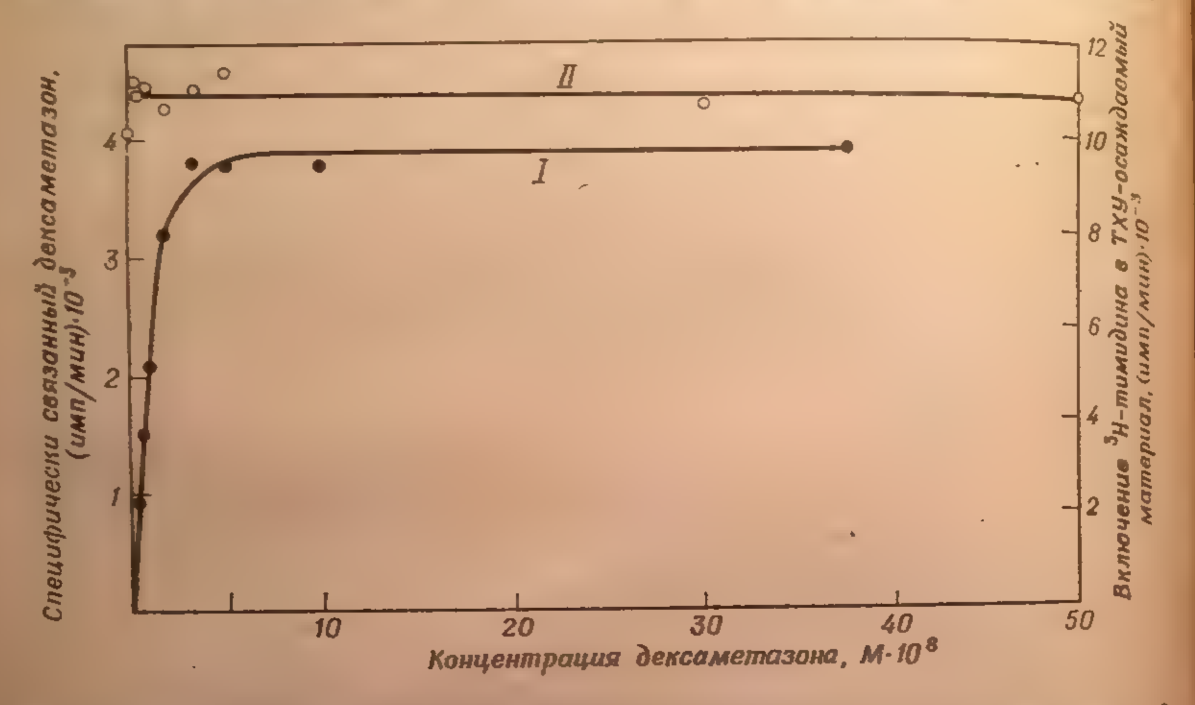



**Рис. 4.** Сравнение данных по связыванию $^3$Н-дексаметазона тканевой культурой линии CCRF 120 лейкемических лимфобластов (*I*) и отсутствию ингибирующего действия стероида на включение тимидина (*II*). ТХУ — трихлоруксусная кислота.

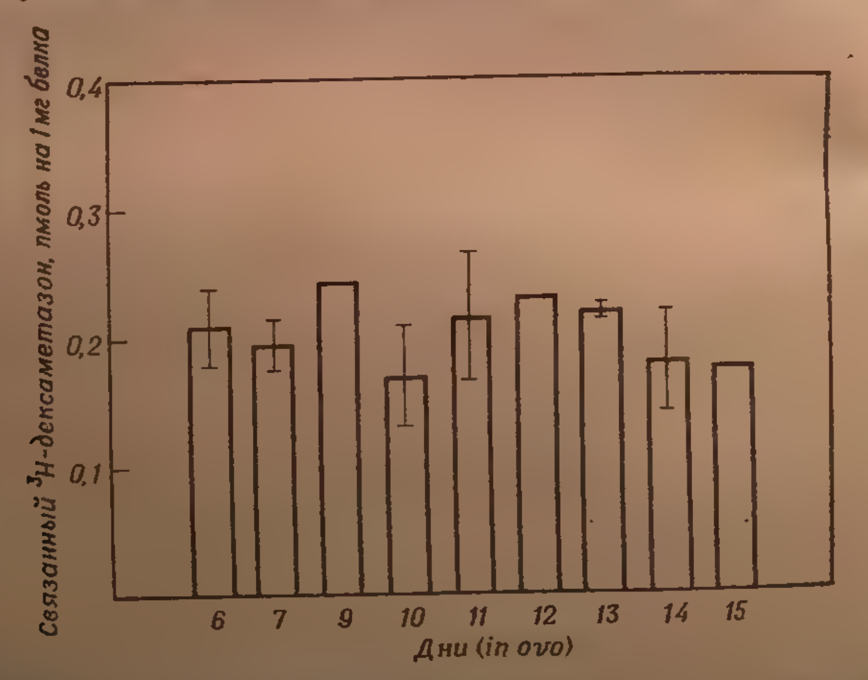



**Рис. 5.** Зависимость глюкокортикоидсвязывающей активности в нейроретине куриных эмбрионов от возраста in ovo.

тазона рецепторами подобных клеток сочетается с отсутствием ингибирующего влияния тех же концентраций дексаметазона на включение нуклеозидов. Таким образом, разрыв цепи событий между вхождением стероида в клетку и характерным для данной клетки эффектом может происходить в звеньях, последующих за первоначальным связыванием гормона и его поступлением в ядро.

Этот вывод подтверждается также результатами изучения онтогенеза. Баллард и Баллард [39] обнаружили, что способность глюкокортикоидов стимулировать накопление сурфактанта в легких плода возникает лишь с появлением глюкокортикоидных рецепторов. Противоположная картина наблюдается в случае нейроретины цыплят, в которой глутамин-синтетаза может быть индуцирована глюкокортикоидными гормонами очень рано — с 10-го дня эмбрионального развития [40]. Нормальное же содержание рецепторов в этой ткани имеется уже к 6-му дню, т. е. тогда, когда фермент еще совершенно нечувствителен к стероидам [41]. На рис. 5 показана динамика изменений рецепторной активности в процессе развития куриных эмбрионов. Поражает несоответствие между практически не изменяющимся содержанием рецепторов и скачкообразным увеличением способности глутамин-синтетазы индуцироваться глюкокортикоидами. Сходные результаты получил Фелдман [42] при изучении печени плода. Несмотря на наличие в цитоплазме рецепторов с нормальными связывающими свойствами, способных транслоцироваться в ядро, глюкокортикоиды не индуцировали синтеза ферментов в печени. Проще всего объяснить это тем, что какие-то, отличные от рецепторов звенья механизма, обеспечивающего реакцию ткани на гормон, еще не созрели. Те же самые данные, однако, могут означать, что не все эффекты глюкокортикоидов опосредуются рецепторами, и поэтому наличие или отсутствие рецепторов не сказывается на проявлении этих эффектов. Такая точка зрения не противоречит основанной на огромном фактическом материале концепции о центральной роли рецепторов в действии глюкокортикоидов. Она лишь указывает, что такие разнообразные процессы, как взаимодействие с кининовой системой [43] и системами кислой рибонуклеазы и ингибитора рибонуклеазы [44], индукция фенотипического выражения вирусного генома [45], осуществляются, как сейчас принято думать, с помощью каких-то механизмов, отличных от обычных, опосредуемых рецепторами, механизмов действия глюкокортикоидов.

## IV. СООТНОШЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ СРОДСТВА К РЕЦЕПТОРАМ И ГОРМОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ

Наиболее убедительным доводом в пользу ключевой роли рецепторов в действии глюкокортикоидов служит соответствие между связыванием гормонов и физиологическим ответом на их действие. Это соответствие выявляется как при сопоставлении степе-

ни сродства гормона в зависимости его эффекта от дозы, так и при сопоставлении гормональной специфичности связывания и биологической активности стероидов.

Во многих системах наблюдается хорошее совпадение концентраций стероидов, связываемых рецепторами и вызывающих характерные для данной ткани эффекты [1]. Так, в своих ранних работах Бакстер и Томкинс [46], анализируя поглощение $^3$H-дексаметазона клетками культуры ткани гепатомы (HTC-клетками), обнаружили, что эффективное концентрирование стероида этими клетками происходит при концентрациях дексаметазона ниже $5 \cdot 10^{-8}$ М. При более высоких концентрациях захват стероида был пропорционален его концентрации, что свидетельствовало о насыщении ограниченного количества либо связывающих, либо транспортных мест. Между концентрациями стероида, которые вызывали насыщение этих мест, и теми его концентрациями, которые изменяли содержание индуцируемого фермента тирозинтрансаминазы, наблюдалось хорошее соответствие. В более поздних экспериментах тех же авторов с помощью метода адсорбции на угле было установлено существование в цитозоле мест, связывающих стероид с высоким сродством [20, 47]. Скэтчардовский анализ показал, что эти места, по-видимому, однородны по сродству к глюкокортикоиду ($K_d \approx 3 \cdot 10^{-9}$ М) и обладают ограниченной емкостью. У многих стероидов исследовали способность конкурировать с $^3$H-дексаметазоном за рецепторы HTC-клеток [19, 20]. Было установлено, что связывание является обратимым; константа диссоциации, полученная путем определения констант скоростей ассоциации и диссоциации, была близка к аналогичной величине, полученной в условиях равновесия. Кроме того, исследовали способность большого ряда стероидов вытеснять $^3$H-дексаметазон из комплексов с глюкокортикоидными рецепторами. Как и следовало ожидать, все сильные глюкокортикоиды хорошо вытесняли дексаметазон из связывающих участков рецепторов. Анализировать данные по связыванию стероидов удобно с точки зрения их биологической активности. По предложенной Сэмюэлсом и Томкинсом [48] классификации, стероиды делятся на неактивные, антииндукторы, субоптимальные и оптимальные индукторы. Было обнаружено, что неактивные стероиды (т. е. те, которые не вызывают биологического эффекта сами и не препятствуют действию других стероидов) не обладают существенным сродством к специфическим рецепторам глюкокортикоидов. Антииндукторы (стероиды, не обладающие собственной биологической активностью, но препятствующие действию оптимальных индукторов), такие, как прогестерон, 17β-эстрадиол и кортизон, хорошо конкурируют за связывающие места рецепторов. Субоптимальные индукторы (стероиды, оказывающие частично синергичное действие), такие, как 17α-оксипрогестерон или 5α-дигидрокортизол, могут при достаточно высоких концентрациях полностью вытеснить $^3$H-дексаметазон из комплекссов с рецепторами.

Аналогичные результаты были получены для лимфобластов человека [35, 49], тимоцитов [50] и лимфосаркомы Р-1798 [51].

Более подробный анализ влияния структуры стероида на его связывание рецепторами провели Руссо и др. [20]. Было обнаружено, что удаление двойной связи в кольце А стероида приводит к снижению как сродства к рецепторам, так и биологической активности. Модификации при 11-м углеродном атоме резко уменьшают биологическую эффективность стероида. Окисление 11-β-ОН до кетогруппы (образование кортизона из кортизола) приводит к превращению оптимального индуктора в антииндуктор. Замена 11 β-гидроксила на 11 α-гидроксил всегда снижает и сродство к рецепторам, и биологическую активность. Сходные данные получены для лимфосаркомы Р-1798 [26, 26а]. Руссо и др. [20] исследовали и другие стороны стероид-рецепторного взаимодействия. Обнаружив, что стероиды, являющиеся оптимальными индукторами, предохраняют рецепторный белок от тепловой денатурации, эти авторы предположили, что цитоплазматические рецепторы существуют в двух конфигурациях — активной и неактивной. При этом антииндукторы типа прогестерона должны связываться преимущественно с неактивной формой, тогда как оптимальные индукторы при связывании должны изменять конформацию рецепторной молекулы в сторону активной конфигурации. Впервые подобная модель аллостерического взаимодействия была предложена Моно [52]. В пользу этой гипотезы говорит тот факт, что оптимальные индукторы и антииндукторы связываются с одним и тем же рецептором, но обладают различным сродством к этому белку. Общее число связывающих мест, определяемых в экспериментах по конкуренции, остается неизменным. Примечательно также, что скорости ассоциации с рецептором и диссоциации стероид-рецепторных комплексов для антииндуктора прогестерона выше, чем для оптимального индуктора дексаметазона. Более того, рецептор оказывается значительно устойчивее к тепловой денатурации, если он находится в комплексе не с антииндуктором, а с оптимальным индуктором. Стабилизирующее действие глюкокортикоидов на рецепторы обнаружили также Мунк и сотр. [53] в тимоцитах и в клетках лимфосаркомы Р-1798. Таким образом, гипотеза о существовании определенных структурно-функциональных взаимоотношений стероида и рецептора весьма привлекательна, хотя и не доказана.

При сопоставлении тех концентраций стероида, которые могут быть связаны рецепторами, и тех его концентраций, которые вызывают характерный ответ, обычно обнаруживается хорошее совпадение. Кривые, приведенные на рис. 6, позволяют сопоставить связывание $^{3}H$-дексаметазона рецепторами лейкемических лимфобластов и подавление дексаметазоном функционирования этих клеток. Можно видеть, что для чувствительных к глюкокортикоидам клеток (верхняя часть рисунка) кривые связывания стероида рецепторами и ингибирования включения нуклеозидов являются почти

точным зеркальным отражением друг друга. Это служит веским доводом в пользу участия рецепторов в механизме ингибирующего действия стероида [35]. И наоборот, отсутствию ингибирующего действия стероида в лейкемических клетках больных, нечувствительных к лечению глюкокортикоидами, соответствует отсутствие рецепторной активности. Аналогичные результаты были получены в опытах с мышиными фибробластами [55, 56], клетками HeLa [57] и некоторыми гибридами соматических клеток: фибробластов и клеток гепатомы [58]. Эти ярко выраженные взаимосвязи служат

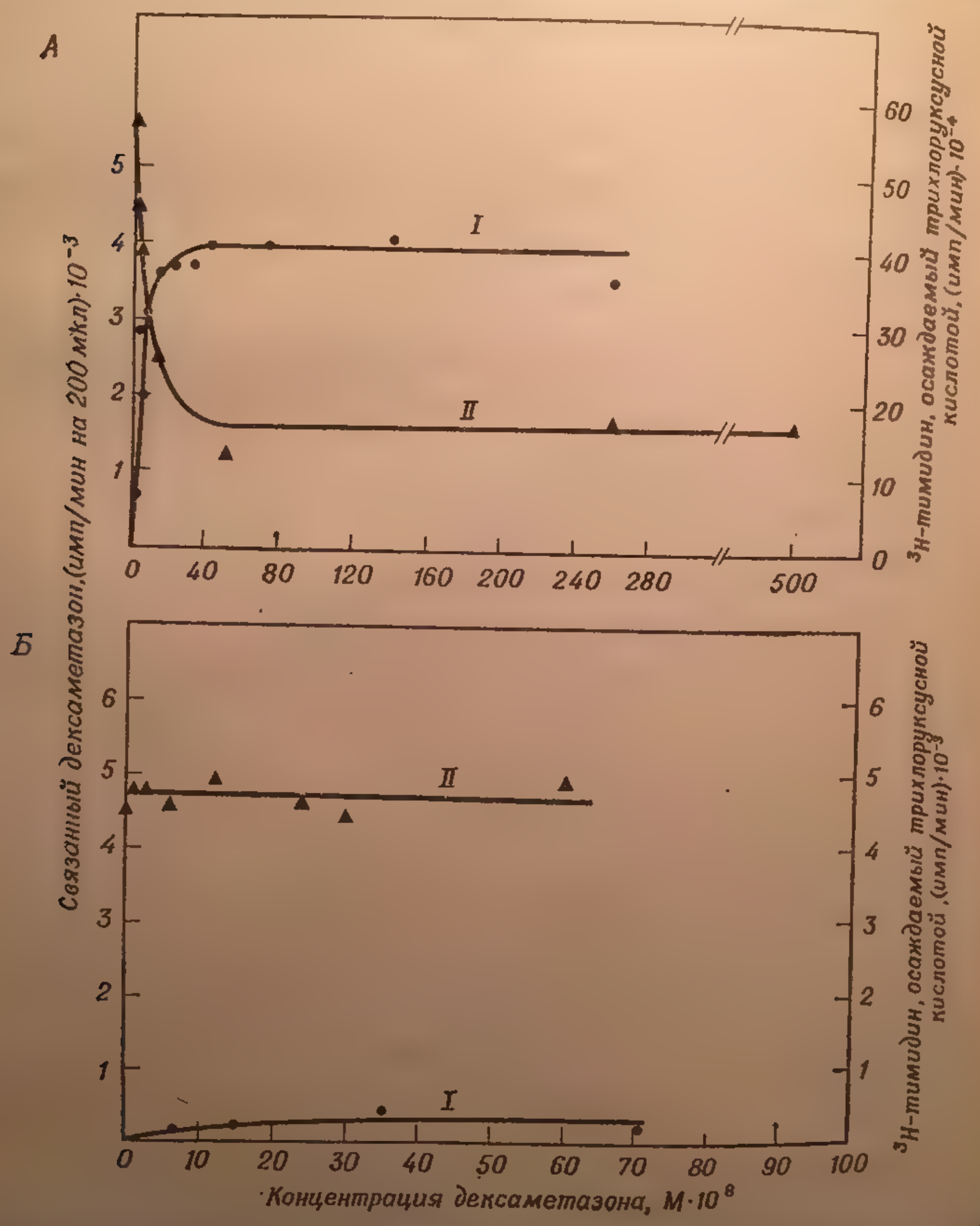



**Рис. 6.** Сравнение данных по связыванию $^3$H-дексаметазона рецепторами и подавлению включения нуклеозидов в лимфобластах человека. Связывание стероида рецепторами (*I*) и включение тимидина (*II*) в лимфобластах больных, чувствительных (А) и нечувствительных (Б) к лечению глюкокортикоидами.

важным доказательством причинной зависимости между связыванием стероида рецепторами и гормональным действием.

Остается необъяснимым очень любопытный факт: в отдельных случаях наблюдается значительное увеличение связывания при высоких концентрациях стероида. Непосредственной связи этого явления с биологическим эффектом пока не обнаружено. Так, Холландер и Стивенс [59] отметили, что связывание $^3H$-кортизола с рецепторами из опухолевых клеток лимфосаркомы P-1798 увеличивается в присутствии избытка 9$\alpha$-фторпреднизолона. Литуок и Розенфилд [60], изучая связывание стероида с частично очищенным рецепторным компонентом печени, названным «IA», обнаружили, что при повышении концентрации дексаметазона до 50 нМ наблюдалось обычное снижение степени связывания гормона рецептором. Но при бо́льших концентрациях глюкокортикоида ингибирование связывания носило иной, неожиданный характер. Мы также наблюдали, что в некоторых случаях при концентрациях конкурента выше определенного уровня пробы с добавленным конкурентом и без него как бы меняются местами — количество связанной радиоактивности в присутствии конкурента оказывается выше, чем в его отсутствие [61]. Одно из возможных объяснений этого феномена может заключаться в том, что при более высоких концентрациях стероида с ним начинают взаимодействовать новые места связывания, обладающие низким сродством. Вопрос о том, являются ли эти наблюдения артефактом или же они имеют физиологическое значение, весьма важен. Это обусловлено тем, что механизм, посредством которого глюкокортикоиды в очень высоких концентрациях взаимодействуют с клетками, наверняка не включает в себя описанные выше рецепторы. Наблюдаемые же изменения в функциях клеток при действии высоких доз гормонов выражены очень отчетливо [2].

## V. РЕЦЕПТОРЫ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ, ГИБРИДНЫХ КЛЕТКАХ И В НЕЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К СТЕРОИДАМ ЛИНИЯХ КЛЕТОК

В силу того что глюкокортикоиды резко подавляют метаболическую активность и даже вызывают гибель клеток многих типов, часто удается выделить популяции клеток, нечувствительных к стероидам. Это достигается либо введением гормонов животным-опухоленосителям [54] или больным лейкемией [35], либо обработкой гормоном клеточных линий тканевых культур [37, 54, 55], причем концентрация глюкокортикоидов должна быть достаточно высокой, чтобы привести к гибели чувствительные к гормонам клетки или подавить их активность. Линии таких измененных или мутантных, клеток, лишенных способности нормально отвечать на действие стероидов, очень удобны для выяснения роли рецепторов. Данные, приведенные на рис. 7, дают возможность

сравнить связывание ³H-дексаметазона и подавление включения нуклеозидов в ингибированных глюкокортикоидами мышиных фибробластах линии LA-9. Можно видеть, что между концентра-

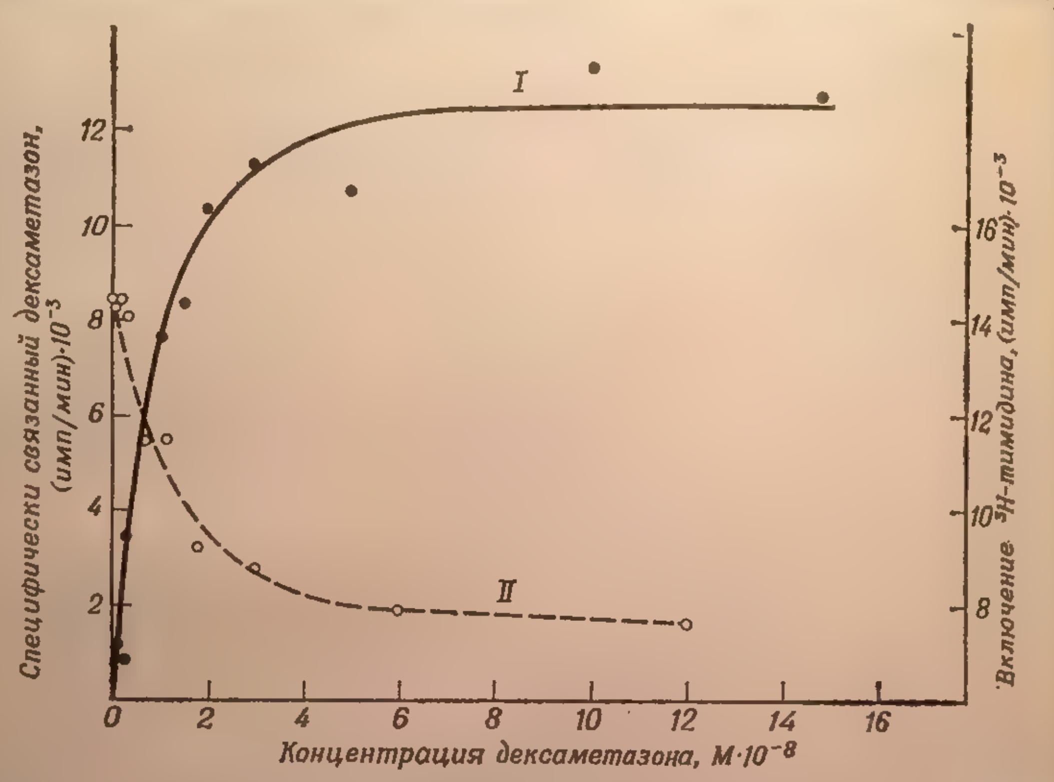



**Рис. 7.** Сопоставление связывания ³H-дексаметазона рецепторами (*I*) и ингибирования включения нуклеозидов в чувствительные к стероиду лимфобласты мыши линии LA-9 (*II*).

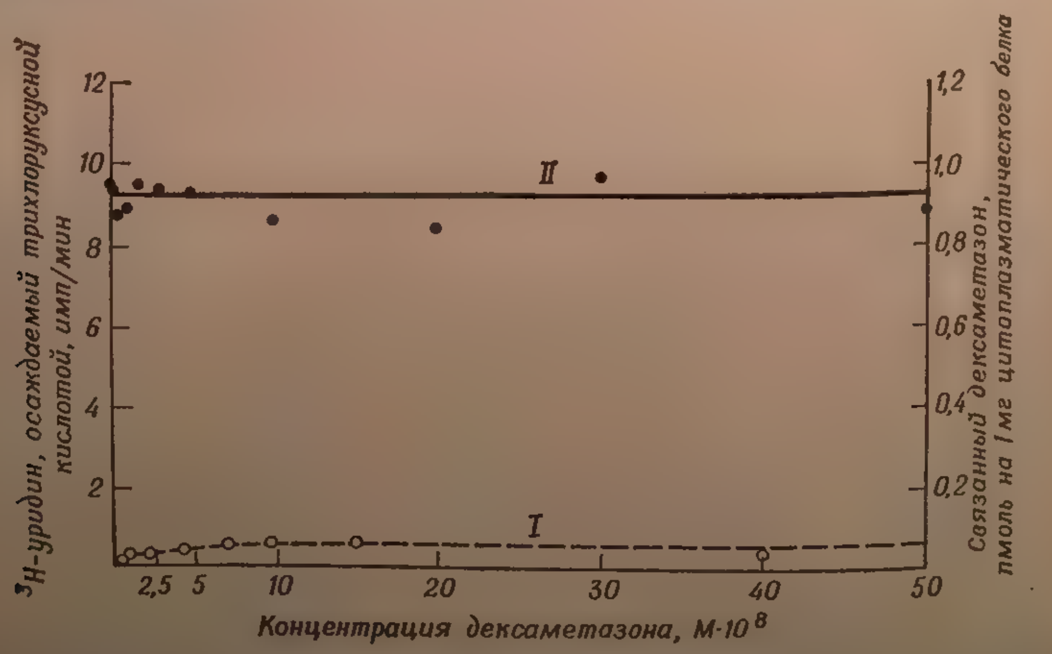



**Рис. 8.** Сравнение связывания ³H-дексаметазона рецепторами устойчивых к стероиду лимфобластов мыши (*I*) и отсутствия ингибирующего действия стероида на включение в нуклеозиды (*II*).

циями стероида, ингибирующими клетки, и концентрациями стероида, связывающимися цитоплазматическими рецепторами, наблюдается хорошее соответствие. Результаты выделения резистентных к глюкокортикоиду клонов из линии мышиных фибробластов, предварительно ингибированных стероидом, показаны на рис. 8. Можно видеть, что нечувствительные клетки лишены и рецепторной активности, и способности к ингибированию глюкокортикоидами. Во всех цитированных и в ряде других работ показано, что содержание выявляемых цитоплазматических рецепторов в нечувствительных клетках падает до уровня, составляющего менее 25% контроля. Но, что весьма интересно, еще никто не сообщал о полной потере рецепторов. Этот факт может свидетельствовать о существовании многочисленных классов рецепторов, обслуживающих различные функции клеток (см. ниже). Приведенные данные убедительно показывают, что большинство гормональных эффектов осуществляется с участием рецепторного звена. Имеются, однако, и исключения из «типичной» формы резистентности к стероидам. Так, нами охарактеризовано несколько линий лейкемических лимфобластов человека, которые, хотя и лишены полностью чувствительности к глюкокортикоидам, содержали нормальное количество рецепторов. При этом выявляемые рецепторы по специфичности связывания, сродству к гормонам и способности связываться с ядрами клеток-мишеней были идентичны нормальным рецепторам [37]. Сходные результаты сообщались и другими авторами [38]. Более того, гибридные клетки, полученные слиянием НТС-клеток и L-клеток мыши, отвечают на действие стероидов лишь по типу L-клеток, несмотря на присутствие цитоплазматических рецепторов из родительских НТС-клеток [55, 58]. В таких гибридах, например, в отличие от НТС-клеток, глюкокортикоиды не индуцируют синтеза фентРНК и тирозинтрансаминазу. Все же ответы на глюкокортикоиды, характерные для L-клеток (ингибирование поглощения глюкозы, синтеза макромолекул, роста клеток), в гибридных клетках сохраняются. Имеющиеся данные позволяют думать, что рецепторы глюкокортикоидов в гибридных клетках ведут свое происхождение от родительских НТС-клеток. Таким образом, неспособность гибридных клеток отвечать на действие глюкокортикоидов по типу НТС-клеток, очевидно, обусловлена не отсутствием рецепторов. Можно предполагать, что наблюдаемый эффект определяется «доминированием» в гибридах ингибирующего действия кортикоидов (характерного для L-клеток) над их стимулирующим влиянием (характерным для НТС-клеток). Иная картина наблюдалась при гибридизации нормальных клеток культуры гепатомы и резистентных к стероидам L-клеток, не содержавших рецепторов (см. рис. 8). Такие гибриды, хотя и содержали рецепторы (очевидно, от родительских НТС-клеток), не отвечали на действие глюкокортикоидов ни по типу НТС-клеток, ни по типу L-клеток. Однако

иногда гормональную чувствительность удается восстановить с помощью гибридизации клеток нечувствительной линии, содержащих рецепторы, с чувствительными клетками [38]. Недавно группой Томкинса [62, 63] было охарактеризовано несколько типов нечувствительных к кортикоидным гормонам линий клеток. В клетках первого типа явно изменено количество рецепторов, в клетках второго типа нарушено, по-видимому, не связывание стероидов с рецепторами, а взаимодействие гормон-рецепторных комплексов с ядром. В некоторых случаях это обусловлено, вероятно, каким-то дефектом ядер (или ядерных мембран), поскольку цитоплазматические рецепторы таких клеток нормально взаимодействуют с ядрами других тканей-мишеней. В иных же случаях, как показывают результаты экспериментов по связыванию рецепторов с ядрами in vitro, нарушена, очевидно, структура самих рецепторов. Нечувствительные к глюкокортикоидам клетки третьего типа содержат, по всей вероятности, нормальные рецепторы, которые способны транслоцироваться в ядро. Тем не менее такие клетки не реагируют на добавление дексаметазона. Эти клетки получили название бессмертных. Комплементационные исследования, выполненные при помощи соматической гибридизации между такими мутантными «классами» открывают широкие перспективы для проникновения в тайны механизмов действия глюкокортикоидов. Итак, очевидно, что хотя присутствие рецепторов — условие абсолютно необходимое для проявления большинства эффектов стероидов, выявление рецепторных белков не может служить надежной гарантией наличия у клетки чувствительности к гормону.

## VI. ОЧИСТКА РЕЦЕПТОРОВ

Как уже упоминалось, результаты предпринимавшихся до сих пор попыток очистить глюкокортикоидные рецепторы не увенчались полным успехом. Литуок и др. [64—68] проделали большую работу по изучению компонентов, связывающих стероиды, в печени. Морей и Литуок [64], фракционируя цитозоль с помощью ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе, обнаружили три связывающих компонента. Эти компоненты получили название комплексообразователей I, II и III в соответствии с порядком их элюции градиентом концентрации соли [65]. В результате применения более пологих градиентов был выделен новый связывающий компонент — комплексообразователь IV [66]. Идентификация метаболитов кортизола, связанных с очищенными комплексообразователями I и III, показала, что эти метаболиты представляют собой серные эфиры тетрагидрокортизола [64]. В связи с этим маловероятно, чтобы какой-либо из этих белков мог оказаться истинным рецептором гормонов. Весьма подробно исследовалось сродство выявленных комплексообразователей к различным сте-

роидам [65]. В отличие от других связывающих компонентов
комплексообразователь II связывает преимущественно кортизол и
биологически активные синтетические глюкокортикоиды. Сродство
же этого компонента к метаболитам кортикоидов и соединениям,
не относящимся к глюкокортикоидам, невелико. Позднее те же
авторы охарактеризовали рецепторы глюкокортикоидов, выделен-
ные из гепатомы Н-35 Реубера и из НТС-клеток [67]. Глюкокор-
тикоидные рецепторы этих клеток по параметрам элюции с ДЭАЭ-
колонок, значениям pI, величинам сродства и специфичности к
глюкокортикоидам были сходны с комплексообразователем II кле-
ток нормальной печени. С помощью классических методов этот
комплексообразователь был в значительной степени очищен [68].
Величина молекулярного веса этого белка по данным гельфильт-
рации составляет 67 000 дальтон. Константы диссоциации для
дексаметазона и кортизола равны, соответственно $6 \cdot 10^{-10}$ и
$\sim 10^{-8}$ М. Этот частично очищенный рецептор обладал способ-
ностью переносить кортизол в изолированные ядра. Выделенный
при последующей солевой экстракции таких ядер белок обладал
свойствами, близкими к свойствам комплексообразователя II, пер-
воначально выделенного из цитозоля (критерии: элюция с ДЭАЭ,
величины pI, сродство к гормонам). Эти авторы получили антите-
ла к данному белку, которые не давали перекрестной реакции с
другими известными белками, связывающими кортикостероиды,
включая КСГ. Недавно той же группой исследователей был выде-
лен еще один «рецептор» печени — комплексообразователь IB [60].
Этот белок обладает очень близкой с комплексообразователем
II специфичностью связывания; величина $K_d$ этого белка для дек-
саметазона равна 10 нМ.

В исследованиях .группы Фейгельсона и сотр. [6, 24, 69] были
получены результаты, сходные в основном с приведенными выше.
Эти исследователи выявили в печени связывающий компонент G,
который по своему сродству и специфичности к глюкокортикоидам
отвечает критериям рецепторов и очень близок к комплексообра-
зователю II Литуока (см. выше). Авторы показали, что в распре-
делении компонента «G» имеется значительная тканевая специ-
фичность: этот компонент локализуется преимущественно в тка-
нях-мишенях. При центрифугировании в градиенте концентрации
сахарозы с низкой концентрацией соли константа седиментации
этого компонента составляла 7S, а в градиенте с высокой концен-
трацией соли — 4S. Рассчитанный молекулярный вес «низкосоле-
вой» формы рецепторов (7S) был равен 200 000 дальтон, а кажу-
щийся молекулярный вес «высокосолевой» формы — 66 000 даль-
тон. Фрикционное отношение ($f/f_0$) этой формы равнялось 1,35.

Совсем недавно Санти и сотр, [70] предприняли попытку очис-
тить рецепторы глюкокортикоидов с помощью аффинной хрома-
тографии. В принципе такой подход должен быть чрезвычайно
плодотворным. Пользуясь этим методом, Пука и др. [71] очисти-

ли рецепторы эстрадиола в несколько тысяч раз. К сожалению, главная трудность — элюция рецепторных молекул, которые удалось бы затем выявить, — в отношении глюкокортикоидов до сих пор не преодолена.

За последнее десятилетие была сформулирована общая концепция механизма действия стероидных гормонов; центральная роль в этом механизме отводится рецепторам. Будущие успехи в очистке этих рецепторов, т. е. в области, в которой сейчас делаются лишь первые шаги, позволят гораздо яснее представить себе, каким образом рецепторы взаимодействуют с геномом клеток-мишеней и модулируют фенотипическое выражение гена.

## VII. ПОСЛЕДНИЕ ДОСТИЖЕНИЯ

Исследования резистентных к глюкокортикоидам линий клеток лимфомы мышей в культуре ткани получили значительное развитие в работах Ямамото и др. [72, 73]. Путем тщательного клонирования эти авторы выделили множество сублиний резистентных к глюкокортикоидам клеток, которые можно, очевидно, разделить на четыре фенотипических варианта. В этих клетках были тщательно изучены биохимические свойства рецепторов. Кроме того, с помощью метода гибридизации соматических клеток авторы сделали попытку «исправить» дефекты в действии глюкокортикоидов. Использование подобных клеток для выяснения поставленных вопросов с позиций генетики является весьма многообещающим.

Та же группа исследователей предложила недавно еще одну систему для анализа действия глюкокортикоидов. Они установили, что дексаметазон способен индуцировать онкогенный вирус в культуре клеток рака молочной железы GR-мышей.

Недавно было обнаружено, что некоторые линии клеток рака молочной железы человека, культивированные iv vitro, содержат рецепторы и для глюкокортикоидов, и для прогестерона [75, 76]. Глюкокортикоиды вызывают резкое снижение синтеза ДНК, но не вызывают гибели этих клеток. Используя клеточные линии с точно установленными признаками рака молочной железы, возможно удастся доказать, что выводы, основанные на изучении линий клеток грызунов, носят общий характер.

И наконец, с помощью метода определения связывания целыми клетками недавно были охарактеризованы рецепторы глюкокортикоидов в лимфоцитах периферической крови человека [77]. Обработка клеток в течение 10 ч фитогемагглютинином способствует увеличению количества рецепторных мест связывания в 2—4 раза. По своему сродству к стероидам и специфичности связывания индуцированный рецептор не отличается от рецепторов нестимулированных клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *King R. J. B., Mainwaring W. I. P.*, University Park Press, Baltimore, Md., 1974.
2. *Thompson E., Lippman M.*, Metabolism, *23*, 159 (1974).
3. *Wicks W. D.*, in: Biochemistry of Hormones (H. V. Rickenberg, ed.), University Park Press, Baltimore, Md., 1974.
4. *Baxter J. D., Forsham P. H.*, Am. J. Med., *53*, 573 (1972).
5. *Beato M., Biesewig D., Braendle W., Sekeris C. E.*, Biochim. Biophys. Acta, *192*, 494 (1967).
6. *Koblinsky M., Beato M., Kalimi M., Feigelson P.*, J. Biol. Chem., *247*, 7897 (1972).
7. *Morey K. S., Litwack G.*, Biochemistry, 7, 3409 (1968).
8. *Fiala E. S., Litwack G.*, Biophys. Acta, *124*, 260 (1966).
9. *Williams-Ashman H. G., Reddi A. H.*, Annu. Rev. Physiol., *33*, 31 (1971).
10. *Lippman M. E., Perry S., Thompson E. B.*, J. Steroid Biochem., *5*, 461 (1974).
11. *Rodbard D.*, in: Receptors for Reproductive Hormones (B. W. O'Malley and A. R. Means, eds.), Plenum Press, New York, 1973.
12. *Feldman H., Rodbard D.*, in: Principles of Competitive Protein Binding Assays (W. Odell and W. Daughaday, eds.), Lippincott, Philadelphia, Pa., 1971.
13. *Dingman C. W., Sporn M. B.*, Science, *149*, 1251 (1965).
14. *Litwack G., Fiala E. S., Filosa R. J.*, Biochim. Biophys. Acta, *111*, 569 (1965).
15. *Morris D. J., Barnes F. W.*, Biochim. Biophys. Acta, *136*, 67 (1967).
16. *Morris D. J., Sharma M. H., Barnes F. W.*, Endocrinology, *89*, 1109 (1971).
17. *Gardner R. S., Tomkins J. M.*, J. Biol. Chem., *244*, 4761 (1969).
18. *Korenman S. G., Perrin L. E., McCallum T. P.*, J. Clin. Endocrinol., *29*, 879 (1969).
19. *Baxter J. D., Tomkins J. M.*, Proc. Natl. Acad. Sci., *68*, 932 (1971).
20. *Rousseau G., Baxter J., Tomkins G.*, J. Mol. Biol., *67*, 99 (1972).
21. *McGuire W. L., Chamness G. C.*, in: Receptors for Reproductive Hormones (B. W. O'Malley and A. R. Means, eds.), Plenum Press, New York, 1973.
22. *Klinga K.*, J. Steroid Biochem., *5*, 337 (1974).
23. *Santi D. V., Sibley C., Perriard E., Tomkins G. M., Baxter J. D.*, Biochemistry, *12*, 2412 (1973).
24. *Kalimi M., Colman P., Feigelson P.*, J. Biol. Chem., *250*, 1080 (1975).
25. *Pratt W., Ishii D.*, Biochemistry, *16*, 1401 (1972).
26. *Hollander N., Chiu Y. W.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *25*, 291 (1966).
26a. *Kirkpatrick A. F., Milholland R. J., Rosen F.*, Nature [New Biol.], *232*, 216 (1971).
27. *Giannopoulos G., Hassan Z., Solomon, S.*, J. Biol. Chem., *249*, 2424 (1974).
28. *McEwen B. S., Magnus C., Wallach G.*, Endocrinology, *90*, 217 (1972).
29. *Castañeda E., Liao S.*, Endocrinol. Res. Commun., *1*, 271 (1974).
30. *Castañeda E., Liao S.*, J. Biol. Chem., *250*, 883 (1975).
31. *Erdos T., Best-Belpomme M., Bessada R.*, Anal. Biochem., *37*, 244 (1970).
32. *Steggles A. W., King R. J. B.*, Biochem. J., *118*, 695 (1970).
33. *Pita J., Lippman M. E., Thompson E. B., Loriaux D. L.*, Submitted to Endocrinology.
34. *Kirkpatrick A. F., Kaiser N., Mitholland R. J., Rosen F. J.*, Biol. Chem., *247*, 70 (1972).
35. *Lippman M. E., Halterman R. H., Leventhal B. G., Perry S., Thompson E. B.*, J. Clin. Invest., *52*, 1715 (1973).
36. *Baxter J. D., Harris A. W., Tomkins G. M., Coker M.*, Science, *171*, 189 (1971).
37. *Lippman M., Perry S., Thompson E.*, Cancer Res., *34*, 1572 (1974).
38. *Gehring U., Mohit B., Tompkins J. M.*, Proc. Natl. Acad. Sci., *69*, 3124 (1972).
39. *Ballard P. L., Ballard R. A.*, J. Clin. Invest., *53*, 477 (1974).
40. *Chader G. J., Reif-Lehrer L.*, Biochim. Biophys. Acta, *264*, 186 (1972).
41. *Lippman M., Wiggert B., Chader G., Thompson E.*, J. Biol. Chem., *249*, 5916 (1974).
42. *Feldman D.*, J. Steroid Biochem., *5*, 350 (1974).

43. *Cline M. J., Melmon K. L.*, Science, *153*, 1135 (1966).
44. *Ambellan E.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *57*, 520 (1974).
45. *Parks W., Scholnick E., Kozikowski E.*, Science, *184*, 158 (1974).
46. *Baxter J. D., Tomkins G. M.*, Proc. Natl. Acad. Sci., *65*, 709 (1970).
47. *Baxter J. D.*, Springer-Verlag, New York, 1971.
48. *Samuels H. H., Tomkins J. M.*, J. Mol. Biol., *52*, 57 (1970).
49. *Lippman M., Halterman R., Perry S., Leventhal B., Thompson E. B.*, Nature [New Biol.], *157* (1973).
50. *Munck A., Brinck-Johnson C. J.*, Biol. Chem., *243*, 5556 (1968).
51. *Hollander N., Chiu J. W.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *25*, 291 (1966).
52. *Monod J.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *78*, 412 (1966).
53. *Munck A., Wira G., Young D. A., Mosher K. M., Hallahan C., Bell P. A.*, J. Steroid Biochem., *3*, 567 (1972).
54. *Kaiser N., Milholland R. J., Rosen F.*, Cancer Res., *34*, 621 (1974).
55. *Lippman M., Thompson E.*, J. Biol. Chem., *249*, 2483 (1974).
56. *Hackney J. F., Gross S. R., Aronaw L., Pratt W. B.*, Mol. Pharmacol., *6*, 500 (1970).
57. *Melnkovych G., Bishop C. F.*, Biochim. Biophys. Acta, *177*, 579 (1969).
58. *Lippman M. E., Thompson E. B.*, Nature, *246*, 352 (1973).
59. *Hollander N., Stevens Y. W.*, in: Research on Steroids (M. Finkelstein, A. Klopper, C. Conti and C. Cassano, eds.), Pergamon Viewey, Oxford, 1970.
60. *Litwack G., Rosenfield S. A.*, J. Steroid Biochem., *5*, 335 (1974).
61. *Lippman M. E., Thompson E. B.*, неопубликованные данные.
62. *Sibley C. H., Tomkins G. M.*, Cell, *2*, 213 (1974).
63. *Sibley C. H., Tomkins G. M.*, Cell, *2*, 221 (1974).
64. *Morey K. S., Litwack G.*, Biochemistry, *8*, 4813 (1969).
65. *Singer S., Litwack G.*, Endocrinology, *88*, 1448 (1971).
66. *Litwack G., Morey K. S., Ketterer B.*, in: The Effects of Drugs on Cellular Control Mechanisms (B. R. Rabin, ed.), Macmillan, New York, 1972.
67. *Senger S., Becker J. E., Litwack G.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *52*, 943 (1973).
68. *Litwack G., Filler R., Rosenfield S. A., Lictash N., Wishman C. A., Singer S.*, J. Biol. Chem., *248*, 7481 (1973).
69. *Beato M., Feigelson P.*, J. Biol. Chem., *247*, 7890 (1972).
70. *Failla D. L., Santi D. V., Tomkins G. M.*, J. Steroid Biochem., *5*, 336 (1974).
71. *Sica V., Nola E., Parikk I., Puca G. A., Cuatrecasas P.*, Nature [New Biol.], *244*, 36 (1973).
72. *Yamamoto K. R., Alberts B. M.*, Ann. Rev. Biochem., *45*, 721—746 (1976).
73. *Yamamoto K. R., Gehring U., Stampfer M. R., Sibley C. H.*, Rec. Prog. Hor. Res., *32*, 3—32 (1976).
74. *Ringold G. M., Yamamoto K. R., Tomkins G. M., Bishop J. M., Varmus H. E.*, Cell, *6*, 299—305 (1975).
75. *Lippman M. E., Huff K., Bolan G.*, New York Academy of Sciences (в печати).
76. *Lippman M. E., Osborne C. K., Knazek R., Young N.*, New England Journal of Medicine (в печати).
77. *Neifeld J. P., Lippman M. E., Tormey D. C.*, Clin. Res., *21*, 429A (1976).

# Глава 11

# ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ РЕЦЕПТОРОВ ПРОГЕСТЕРОНА

*Д. ТОФТ, В. МОУДЖИЛ И Ф. ЛОМАР*

Department of Molecular Medicine
Mayo Clinic
Rochester, Minnesota

## I. ВВЕДЕНИЕ

Первые попытки выявить рецепторы прогестерона в тканях-мишенях были не особенно успешными. Из-за быстрого метаболизма прогестерона в чувствительных к нему тканях наблюдать специфическое поглощение этого гормона тканями-мишенями было, как правило, трудно. Осложнения возникали также из-за того, что на содержание рецепторов прогестерона в тканях-мишенях влияют и другие гормоны, и в особенности эстрогены. За последние годы, однако, существование тканевых рецепторов прогестерона было убедительно доказано, и наши знания об этих молекулах сейчас быстро пополняются. В данной главе рассматриваются результаты исследований, касающихся рецепторов прогестерона в тканях птиц и млекопитающих. Кроме того, здесь приведены результаты последних, более детальных исследований, выполненных в нашей лаборатории. С теми аспектами действия прогестерона, которые в этой главе не рассматриваются, можно познакомиться в специальных обзорах [1, 2].

### А. Рецепторы прогестерона в яйцеводах птиц

Впервые специфические для прогестерона связывающие белки четко идентифицировали О'Мэлли и сотр. [3, 4], которые исследовали поглощение и задержку $^3H$-прогестерона в яйцеводах цыплят, получавших эстрогены. Было обнаружено, что $^3H$-прогестерон прочно связывается со специфическими белками цитоплазматической (цитозоль) и ядерной фракцией клеток яйцеводов. Изучение цитоплазматического связывающего белка показало, что по своим свойствам он напоминает рецептор [4, 5]. Этот белок обнаруживается в яйцеводах и отсутствует в нечувствительных к прогестерону тканях. Белок обладает высоким сродством к прогестерону: равновесная константа диссоциации $K_d$ составляет примерно $10^{-10}$ М; в то же время стероиды, не обладающие гестагенной

активностью, либо слабо связываются этим белком, либо не связываются вовсе. Содержание данного белкового компонента в яйцеводах очень низко и, по-видимому, соответствует физиологическим концентрациям гормона.

Связывание $^3$H-прогестерона ядрами было установлено in vivo при введении животным тритированного гормона и in vitro при инкубации ткани яйцеводов в присутствии гормона с последующим выделением ядер и их анализом [6, 7]. В ядре $^3$H-прогестерон оказывается связанным с макромолекулами, которые легко экстрагируются буферным раствором с высокой концентрацией (например, 0,3 М KCl). Этот ядерный связывающий компонент (или рецептор) является, по-видимому, белком, поскольку его активность теряется под действием протеолитических ферментов, агентов, реагирующих с тиоловыми группами, а также под влиянием повышенной температуры [6]. Прогестерон образует прочный комплекс с этим белком, обладающий коэффициентом седиментации 4S при центрифугировании в градиенте концентрации сахарозы в присутствии 0,3 М KCl. Судя по стероидной специфичности, скорости седиментации и поведению при хроматографии, ядерный рецептор почти идентичен рецептору цитозоля (при исследовании последнего в условиях среды с высокой концентрацией соли) [6, 8].

Изучение динамики поглощения прогестерона тканью яйцеводов показало, что связывание стероида первоначально происходит в цитоплазматической фракции, а уже затем — в ядерной [4, 6]. При этом одновременно с увеличением ядерного связывания гормона наблюдается исчезновение рецепторов прогестерона из цитоплазмы. Эти данные свидетельствуют о том, что ядерный гормон-рецепторный комплекс имеет цитоплазматическое происхождение. Полученные результаты находятся в соответствии с моделью действия гормонов, впервые предложенной для эстрогенов [9—11] и распространяемой в настоящее время практически на все стероидные гормоны. Согласно этой модели, когда гормон входит в клетку, он связывается рецепторным белком, локализованным в цитоплазме. В процессе связывания гормон вызывает какие-то перестройки в рецепторной молекуле, что приводит к перемещению рецептора к специфическим внутриядерным акцепторным участкам, расположенным, по-видимому, на хроматине [12]. По существующим представлениям связанный с хроматином рецептор действует (пока еще неизвестно, каким способом) как регулятор синтеза РНК [1, 2].

### Б. Рецепторы прогестерона в матке млекопитающих

О действии прогрестерона в матке млекопитающих известно меньше, чем о его действии у птиц. Тем не менее многими исследователями установлено, что в матке млекопитающих содержатся ци-

топлазматические белки, которые специфически связывают прогестерон. Эти связывающие белки ряда видов, включая крыс [13, 14], морских свинок [15—20], кроликов [20—23], хомячков [24], мышей [13, 14] и человека [25—28], к настоящему времени выделены и частично охарактеризованы. Видовые различия связывающих компонентов матки незначительны. Эти белки обладают рядом общих свойств, которые могут служить указанием на выполнение ими функции цитозольных рецепторов прогестерона: а) обнаруживаются только в тканях-мишенях для прогестерона [16, 29]; б) связывание ими прогестерона отличается высоким сродством и выраженной стероидной специфичностью [18, 19, 21, 24, 26, 28, 30, 31]; в) связывающие участки этих компонентов ограничены в количестве и насыщаемы низкими концентрациями гормона [17, 19, 21, 24].

После введения $^3$H-прогестерона кроликам и морским свинкам рецепторы гормона были обнаружены в клеточных ядрах, выделенных из ткани матки [21, 32]. Экстракция таких ядер кролика раствором с высокой концентрацией соли (0,4 М KCl) приводит к выделению гормона, находящегося в комплексе с 4S-компонентом [21]. С помощью экстракции раствором с высоким содержанием соли было обнаружено наличие комплексов $^3$H-прогестерона с макромолекулами и в ядрах клеток матки морских свинок [32]. Прогестерон в таких комплексах, имеющих коэффициент седиментации 4S, связан, по-видимому, специфически и с высоким сродством. В другом исследовании, проведенном на морских свинках, было показано, что связывание прогестерона ядрами клеток матки — это процесс, зависимый от времени и температуры и требующий присутствия рецепторов цитозоля [33]. Эти результаты находятся в соответствии с концепцией транслокации прогестерон-рецепторных комплексов из цитоплазмы в ядро. Вышеприведенные результаты биохимических исследований подтверждаются результатами радиоавтографических исследований, показавших, что $^3$H-прогестерон в матках крыс [34] и морских свинок [35] локализуется в клеточных ядрах. Таким образом, хотя работы по рецепторам прогестерона у млекопитающих и носят в некоторой степени ограниченный характер, они показывают, что рецепторы прогестерона, по-видимому, выполняют в целом ту же роль, что и рецепторы других стероидных гормонов.

## II. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

### А. Связывание стероидов

Связывающие свойства рецепторов яйцеводов цыплят изучены весьма детально. Использование в более ранних работах различных стероидов показало, что рецепторы связывают преимущественно прогестерон [5]. Позднее специфичность рецепторов была тщательно изучена путем анализа конкурентного связывания более 50

различных стероидов [26]. Большинство из исследованных стероидов связывалось гораздо хуже прогестерона, и лишь у пяти соединений сродство к рецепторам было несколько выше, чем у прогестерона. Все соединения последней группы были синтетическими гестагенами с высокой активностью (например, норгестрел и норэтиндрон). 5α-прегнан-3, 20-дион (5α-дигидропрогестерон), являющийся природным метаболитом, связывается с несколько более низким сродством, чем прогестерон. Это соединение обладает биологической активностью у цыплят и связывается рецепторами в интактной ткани [7]. Поскольку 5α-дигидропрогестерон является главным метаболитом прогестерона, то вполне возможно, что в биологическом действии прогестерона ему принадлежит определенная роль. Однако необходимость этого соединения для проявления гормонального эффекта пока еще не доказана.

Анализ связывания аналогов прогестерона позволяет выяснить вклад той или иной части стероидной молекулы в формирование связывающего сродства [26]. Решающую роль играет ненасыщенная карбонильная функция в кольце А. В то время как насыщение кольца А, как в случае 5α-дигидропрогестерона, оказывает относительно слабое влияние на связывание, гидроксилирование 3-кетогруппы приводит к резкому снижению связывающей способности. Наличие метильной группы в 19-м положении не является необходимым, поскольку некоторые 19-норстероиды очень легко связываются рецептором. Одной из немногих модификаций стероидной молекулы, приводящих к увеличению связывания, является фторирование в положении С-21. При исследовании многочисленных аналогов прогестерона было обнаружено, что стероид взаимодействует с рецептором и α- и β-поверхностями; следовательно, молекула гормона, по-видимому, почти полностью окружена связывающим местом рецептора. Подобное предположение находится в соответствии и с данными о медленной кинетике процесса связывания с рецептором (см. ниже).

Вышеприведенные работы показывают, что, как правило, имеется соответствие между связывающим сродством прогестинов и их биологической активностью. Но некоторые сильные прогестины, биологическая активность которых в 10—100 раз выше, чем у прогестерона, связываются лишь в 2—3 раза лучше природного гормона. В этих случаях повышенная гормональная активность стероидов обусловлена, по-видимому, определенными физиологическими факторами, такими, как транспорт в плазме крови и метаболизм.

Связывающее сродство рецепторов птиц к прогестерону очень велико: равновесная константа ($K_d$) равна приблизительно $4 \cdot 10^{10}$ М при 4° [5, 36—38]. Константа скорости ассоциации ($k_a$) составляет примерно $4 \cdot 10^5$ $М^{-1}$ $с^{-1}$; константа скорости диссоциации комплекса ($k_d$) — около $1{,}9 \cdot 10^{-5}$ $с^{-1}$ [38]. Диссоциация комплекса происходит очень медленно с периодом полураспада примерно 12 ч при 4° С.

Рецепторы птиц и млекопитающих несколько различаются по своим связывающим свойствам [13, 26]. Синтетические прогестины, содержащие уксуснокислую группу в 17-м положении (например, хлормадионацетат и медроксипрогестеронацетат), относительно хорошо связываются рецепторами прогестерона млекопитающих (человека), но практически не активны в отношении рецепторов цыплят. Менее выраженные различия обнаружены и для некоторых других соединений [26]. Кинетика связывания прогестерона в этих двух системах также существенно различается. Так, константа скорости диссоциации комплекса прогестерона с рецептором матки мышей составляет примерно $5 \cdot 10^{-3}$ $с^{-1}$ ($t_{1/2} \approx 5$ мин) [13], т. е. диссоциация происходит гораздо быстрее, чем в случае цыплят. Связывающие свойства рецепторов прогестерона матки имеют значительные видовые различия и в пределах класса млекопитающих. Например, скорость диссоциации гормон-рецепторных комплексов сильно различается у разных видов: у мышей и крыс она гораздо выше, чем у хомячков и морских свинок [13, 24, 33]. Специфичность связывания рецепторами прогестерона у различных млекопитающих очень сходна; исключение составляют лишь рецепторы морских свинок, которые очень слабо связывают синтетические прогестины, содержащие ацетатную группу при С-17 [39]. В остальных отношениях рецепторы морских свинок очень сходны с рецепторами других видов животных.

## Б. Структура и состав

Поскольку получение высокоочищенных препаратов рецепторов — задача довольно трудная, большая часть физико-химических свойств прогестеронсвязывающего рецепторного белка была изучена на неочищенных или частично очищенных препаратах цитозоля. Седиментационный анализ поведения гормон-рецепторного комплекса проводили при самых разнообразных условиях. В первых работах сообщалось, что рецепторы яйцеводов цыплят образуют с гормоном комплекс, имеющий в условиях среды с низкой ионной силой коэффициент седиментации 8 S [4, 5]. Однако, как было впоследствии обнаружено, поведение рецепторов при седиментации в условиях низкой ионной силы среды может несколько варьировать. Полученные значения коэффициента седиментации колеблются от 4 до 8S [36, 37], что, вероятно, зависит от различий в условиях экспериментов. В своей сравнительно недавно опубликованной работе Шрейдер и др. [40] предложили объяснение полученным различиям. В этом исследовании при центрифугировании в градиенте концентрации сахарозы было выявлено три типа гормон-рецепторных комплексов: 4S, 6S и 8S. Каждый из этих комплексов, по всей видимости, мог превращаться в другой, а их соотношение зависело от концентрации цитозольного экстракта. С увеличением степени разведения цитозоля наблюдалось снижение содержания

8S-комплекса и повышение содержания 4S-комплекса; количество же 6S-комплекса при этом существенно не менялось. Сходные результаты получили Стансел и др. [41], показавшие, что степень агрегации эстрогенных рецепторов матки зависит от концентрации цитозоля. Значение существования различных форм рецепторов пока еще не установлено.

В присутствии 0,3 М KCl более крупные формы рецепторов обратимо переходят в форму с коэффициентом седиментации около 4S [4, 36]. Такое действие ионной силы на седиментационные свойства является общим для рецепторов почти всех стероидных гормонов [42]. По-видимому, в зависимости от изменений в концентрации солей рецепторы подвергаются процессам агрегации или дезагрегации; тип и количество субъединиц, участвующих в этих процессах, однако, точно не установлены. В форме частично очищенных препаратов рецепторы теряют способность к образованию агрегатов и сохраняют коэффициент седиментации 4S в условиях среды и с высокой, и с низкой ионной силой [38]. Объяснения данному факту до сих пор не найдено, но возможно, что некий фактор или субъединица, необходимые для формирования агрегатов, в процессе очистки теряются.

Формы рецепторов птиц, обнаруживаемые в среде и с высоким, и с низким содержанием солей, в основном представлены, по-видимому, кислыми белками. На основании результатов исследований поведения рецепторов при центрифугировании, электрофорезе и гель-фильтрации были определены молекулярные веса связывающих компонентов с коэффициентами седиментации 7—8 и 4S. По данным гель-электрофореза молекулярный вес наиболее крупной формы рецепторов, обнаруживаемой в среде с низким содержанием солей, равен около 360 000 [5]. Результаты гель-фильтрации на агарозе показали, что форма рецепторов, обнаруживаемая в среде с высоким содержанием солей, является гетерогенной. Полученные этим способом величины молекулярного веса колеблются от 86 000 до 190 000 в зависимости от метода расчетов [5]. При определении молекулярного веса на основании лишь коэффициентов седиментации полученные значения оказываются значительно ниже, чем при определении молекулярных весов другими методами. Это несоответствие свидетельствует об очень высокой степени асимметрии молекул рецепторных белков [5]. Наиболее точные размеры молекул дезагрегированных рецепторов получили, вероятно, Кун и др. [43]. При анализе высокоочищенных препаратов рецепторов с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия было обнаружено наличие двух близких форм рецепторов с молекулярными весами 110 000 и 117 000 дальтон. Эти формы соответствуют рассматриваемым ниже формам A и B.

Некоторая гетерогенность рецепторов прогестерона была обнаружена еще в ранних исследованиях с использованием гельфильтрации [5], однако более четко это было показано в работе Шрей-

дера и О'Мэлли [38], установивших, что при помощи хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе можно получить две формы рецепторов (обозначенные А- и В-формами). Эти формы обладали одинаковой способностью к связыванию стероидов, но несколько различались по стабильности и седиментационным свойствам. В условиях высокой ионной силы обе эти формы седиментировали в области 4S, в среде же с низкой ионной силой форма В оставалась неизменной (4S), а форма А обнаруживала склонность к агрегации и потере связывающей активности. Формы А и В различались также по способности к взаимодействию с компонентами клеточного ядра [8] (см. ниже). Было обнаружено, что содержание компонентов А и В в цитозоле яйцеводов примерно одинаково и что эти компоненты, по-видимому, не превращаются друг в друга.

Цитозольные рецепторы прогестерона недавно были очищены до состояния, близкого к гомогенному [43]. Но даже после такой высокой очистки фракцию рецепторов все еще удавалось разделить с помощью ионообменной хроматографии или гель-электрофореза на компоненты А и В. Эти результаты дают основание думать, что формы А и В действительно представляют собой разные компоненты, а не являются одной и той же молекулой, ведущей себя поразному в результате связывания с нерецепторными компонентами. Однако близкое сходство в размерах и связывающих свойствах компонентов А и В позволяет думать, что эти компоненты, возможно, возникают из общего предшественника. Для дальнейшего изучения физико-химических различий между этими формами рецепторов и возможности их взаимопревращения in vitro и in vivo требуются дополнительные исследования.

Как показали недавно Шерман и др. [37], цитозольные рецепторы прогестерона можно превратить в меньшие по размерам прогестеронсвязывающие единицы с константой седиментации 2,6S и мол. весом около 20 000. Для этого препараты рецепторов обрабатывают двухвалентными катионами, среди которых наибольшей эффективностью обладает кальций. Механизм этого явления не установлен; было высказано предположение, что кальций (возможно, совместно с другими факторами цитозоля) взаимодействует с рецепторами, вызывая их распад или диссоциацию на субъединицы. Диссоциация представляет собой необратимый процесс, поскольку удаление кальция не приводит к реассоциации 2,6S-единиц. 2,6S-компонент обладает теми же связывающими свойствами, что и исходный рецептор. В определенном отношении сходные данные были получены для эстрогенных рецепторов матки: их обработка кальцием в присутствии цитоплазматического белкового фактора приводит к необратимому снижению размеров рецепторов [44, 45]. Остается неясным, имеют ли эти компоненты важное значение in vivo или же это просто артефакты, возникающие in vitro.

Относительно структуры и состава рецепторов прогестерона

млекопитающих известно мало; попытки их очистки носят лишь предварительный характер. Рецепторы матки кроликов фракционировали путем осаждения сульфатом аммония и гель-фильтрации на агарозе [21]. Опубликовано также предварительное сообщение об очистке рецепторов матки человека с помощью аффинной хроматографии на дезоксикортикостерон-сефарозе [46]. Однако использованные методы и свойства очищенных рецепторов не были пока детально описаны. Гормон-рецепторные комплексы большинства видов животных седиментируют в условиях низкой ионной силы со скоростью 6—7 S [18, 20—22, 25, 29]. Однако рецепторы человека, беременных кроликов и беременных морских свинок образуют с гормоном комплексы, седиментирующие со скоростью 4 S [17, 25, 27, 28, 47]. Как и в случае других рецепторных систем, добавление соли (0,3 М KCl) приводит к превращению рецепторов с коэффициентом седиментации 6—7 S в компонент с коэффициентом седиментации 4 S [18, 20—22, 25, 29].

Рецепторы млекопитающих, как правило, очень нестабильны; их стабильность, однако, удается существенно повысить добавлением 20—30% глицерина [13]. Кроме того, при градиентном центрифугировании глицерин способствует седиментации рецепторов в виде более узкой зоны и снижает скорость диссоциации гормон-рецепторных комплексов. Хотя механизм подобных эффектов глицерина не установлен, его использование значительно облегчает изучение рецепторов. В последнее время интерес к рецепторам прогестерона млекопитающих существенно возрос, что, по-видимому, приведет в ближайшие годы к значительному прогрессу в этой области.

## III. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РЕЦЕПТОРОВ ПРОГЕСТЕРОНА С ДРУГИМИ КОМПОНЕНТАМИ КЛЕТКИ

Некоторую ясность в вопрос о функции рецепторов стероидных гормонов может внести изучение их способности взаимодействовать с различными клеточными компонентами. Этот подход в последнее время использовался для идентификации структур, обеспечивающих взаимодействие рецепторов с ядрами в клетках-мишенях. Так, было обнаружено, что рецепторы прогестерона способны связываться и с ДНК [8, 48], и с белками хроматина [13, 49, 50]. Поскольку рецепторы являются относительно крупными белками и выполняют, по-видимому, регуляторную функцию, то вполне возможно, что в клетке эти белки взаимодействуют с одним или несколькими регуляторными соединениями (эффекторами). Исследования по выявлению подобных взаимодействий удобнее всего проводить в бесклеточных системах. Но выяснение биологического значения взаимодействий, обнаруженных в бесклеточных системах, может оказаться трудной задачей, для решения которой потребуется тщательно отсеять артефакты, наблюдаемые при постановке экспериментов in vitro, и установить корреляцию между

полученными данными и результатами исследований in vivo. Ниже приведены результаты последних исследований, выполненных в бесклеточных системах на рецепторах прогестерона птиц.

## А. Связывание с компонентами ядра

При соответствующим образом подобранных условиях комплекс прогестерона с рецептором связывается in vitro хроматиновой фракцией клеточных ядер яйцеводов птиц. В ранних работах было установлено, что в результате инкубации неочищенного ядерного осадка с цитозолем, содержащим $^{3}H$-прогестерон, значительная часть гормон-рецепторных комплексов связывается ядерной фракцией [6]. Этот факт послужил основой для исследований, в которых уже очищенные неповрежденные ядра инкубировали с цитозолем яйцеводов при самых разнообразных условиях [51, 52]. После инкубации ядра и цитозоль вновь разделяли и определяли количество гормон-рецепторных комплексов, экстрагируемых из ядер 0,4 М раствором KCl, и количество комплексов, оставшихся в цитозоле. Было обнаружено, что в такой системе связывание ядрами гормон-рецепторных комплексов зависит от температуры и времени инкубации. При 0° С это связывание было очень небольшим, а при 25° С перемещение гормон-рецепторных комплексов из цитозоля в ядра, судя по захвату рецепторов ядрами и по исчезновению рецепторных белков из цитозоля, было значительным. При 37° С комплекс гормона с рецептором был очень нестабильным: через 1 ч инкубации при этой температуре ни в цитозоле, ни в ядрах практически не оставалось гормона, связанного с рецепторами.

Возникает важный вопрос: отражает ли связывание рецепторов ядрами, наблюдаемое in vitro, процесс, происходящий in vivo. Существует ряд данных, позволяющих ответить на этот вопрос утвердительно. Во-первых, наблюдаемый in vitro процесс зависит от температуры аналогично тому, что наблюдалось «in vivo» при инкубации интактной ткани с прогестероном. Во-вторых, рецепторы ядер, инкубированных in vitro, неотличимы от рецепторов, выделенных из ядер яйцеводов цыплят, получавших $^{3}H$-прогестерон in vivo. Более того, рецепторы не связываются очищенными ядрами в сколько-нибудь значительной степени, если они находятся в комплексе с прогестероном [51, 52]. Это наблюдение, по-видимому, отражает естественный ход событий in vivo, когда перемещение рецепторов в ядро происходит лишь после проникновения в клетку прогестерона.

Дальнейшее изучение связывания рецепторов ядрами в бесклеточной системе показало, что это связывание оптимально при использовании ядер яйцеводов, однако заметное связывание происходит при использовании ядер и других тканей [51]. При попытках количественно оценить связывающую емкость ядер для рецепторов in vitro было обнаружено, что уровень насыщения ядерных участ-

ков изменяется в зависимости от ионной силы инкубационной среды: при увеличении концентрации соли этот уровень снижается [52]. Происходит ли при этом истинное насыщение ядерных участков связывания, не установлено.

Влияние температуры на связывание рецепторов ядрами, наблюдаемое при совместной инкубации ядер и цитозоля при 25° С, является, по существу, влиянием на цитозольную фракцию [51]. Если прогреть один цитозоль при 25° С, то при его последующей инкубации с ядрами при 0° С рецепторы хорошо связываются ядрами. Эффективность прогревания для «активации» рецепторов, т. е. превращения их в форму, взаимодействующую в бесклеточной системе с ядрами, была установлена и в случае рецепторов других стероидных гормонов — эстрогенов [53—56], андрогенов [57—59], глюкокортикоидов [60—62] и минералокортикоидов [63].

Для того чтобы молекулы рецептора могли модифицироваться под влиянием прогревания в активированную форму, по-видимому, необходимо, чтобы рецептор сначала образовал комплекс со стероидом. Попытки выявить корреляцию между активацией рецепторных молекул и изменением их физико-химических свойств были наиболее успешными в случае рецепторов эстрогенов. С помощью градиентного центрифугирования в растворах сахарозы с использованием буферов с высокой концентрацией соли было обнаружено, что комплекс эстрогена с рецептором цитозоля матки крыс после прогревания при 25° С седиментирует как 5 S-единица, а без прогревания — как 4 S-единица [42, 54, 64]. Подобные различия не обнаружены, однако, в случае рецепторов прогестерона, которые седиментируют при центрифугировании в градиенте концентрации сахарозы в присутствии высокой концентрации соли как 4 S-единица, независимо от того, прогревался пред этим цитозоль или нет [51]. Таким образом, физико-химические изменения рецепторов прогестерона, сопровождающие их активацию, данным методом не выявляются.

Было показано, что роль акцепторных мест связывания прогестерон-рецепторных комплексов в ядре могут выполнять и ДНК, и кислые белки хроматина. Так, цитозольные рецепторы обладают in vitro весьма высоким сродством к чистой ДНК [8, 48]. Однако в связывании гормон-рецепторных комплексов изолированным хроматином или ядрами, возможно, принимают участие также специфические белки [12, 48—50]. Хроматин яйцеводов связывает значительно большие количества рецепторов прогестерона по сравнению с хроматином тканей-немишеней. Такая избирательность и сродство в связывании рецепторов хроматином зависят от присутствия фракции кислых белков хроматина и не характерны для связывания рецепторов с ДНК. Кислый белок (белки) может либо непосредственно связывать гормон-рецепторный комплекс, либо оказывать косвенное действие, облегчая взаимодействие рецепторного комплекса с прилегающими участками ДНК. Для решения

вопроса о том, какой из этих механизмов имеет место в действительности, необходимо использовать более тонкие методы экстракции и очистки белков хроматина. В этом направлении делаются определенные успехи, что, возможно, приведет к идентификации специфических белков, которые либо сами по себе, либо в комплексе с ДНК являются ядерными акцепторными местами связывания для стероид-рецепторных комплексов.

Полученные результаты по связыванию рецепторов ДНК и хроматина могут быть интерпретированы с точки зрения гипотезы о необходимости обоих типов связывания для функционирования рецепторов [8, 48]. Возможно, ядерный рецепторный комплекс узнает специфические локусы хроматина с помощью взаимодействия с белками. Тогда прикрепление к таким локусам будет приводить к направленному связыванию рецепторов специфическими участками ДНК, обеспечивая регуляцию фенотипического выражения генов.

Связывание с ДНК и хроматином укладывается в схему, предполагающую существование двух типов рецепторов, каждый из которых взаимодействует либо с ДНК, либо с хроматином. Эта модель основывается на результатах исследований Шрейдера и др. [8] и представляет собой попытку объяснить различия в связывающих свойствах рецепторных компонентов А и В, разделяемых при хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Только компонент А связывается с ДНК, в то время как компонент В обладает высоким сродством к изолированному хроматину. Согласно этой модели, А- и В-формы рецепторов могут действовать в ядре совместно: одна — связываясь с белком, а другая — с ДНК. Но не исключено также, что компоненты А и В представляют собой два функциональных состояния одной и той же рецепторной молекулы. In vivo эти состояния могут последовательно меняться, так что сначала рецептор прикрепляется к белкам хроматина (в форме В), а затем к ДНК ( в форме А). Совершенно ясно, что для выяснения вопроса о том, какой же из этих механизмов имеет место в действительности, необходимо проведение дальнейших исследований.

## Б. Связывание с АТФ

В лаборатории авторов недавно было исследовано взаимодействие рецепторов прогестерона птиц с различными нуклеотидами [65]. Наш интерес к нуклеотидам возник из сделанного нами наблюдения, что добавление АТФ к неочищенному цитозолю матки коров приводит к некоторому увеличению связывания прогестерона рецепторами. Для того чтобы выяснить, не обусловлен ли этот эффект непосредственным связыванием АТФ рецепторами прогестерона, мы использовали метод аффинной хроматографии. АТФ ковалентно прикрепляли к сефарозе-4В по методу Лемеда и др. [66]. Данным способом рибоза АТФ ковалентно присоединяется к

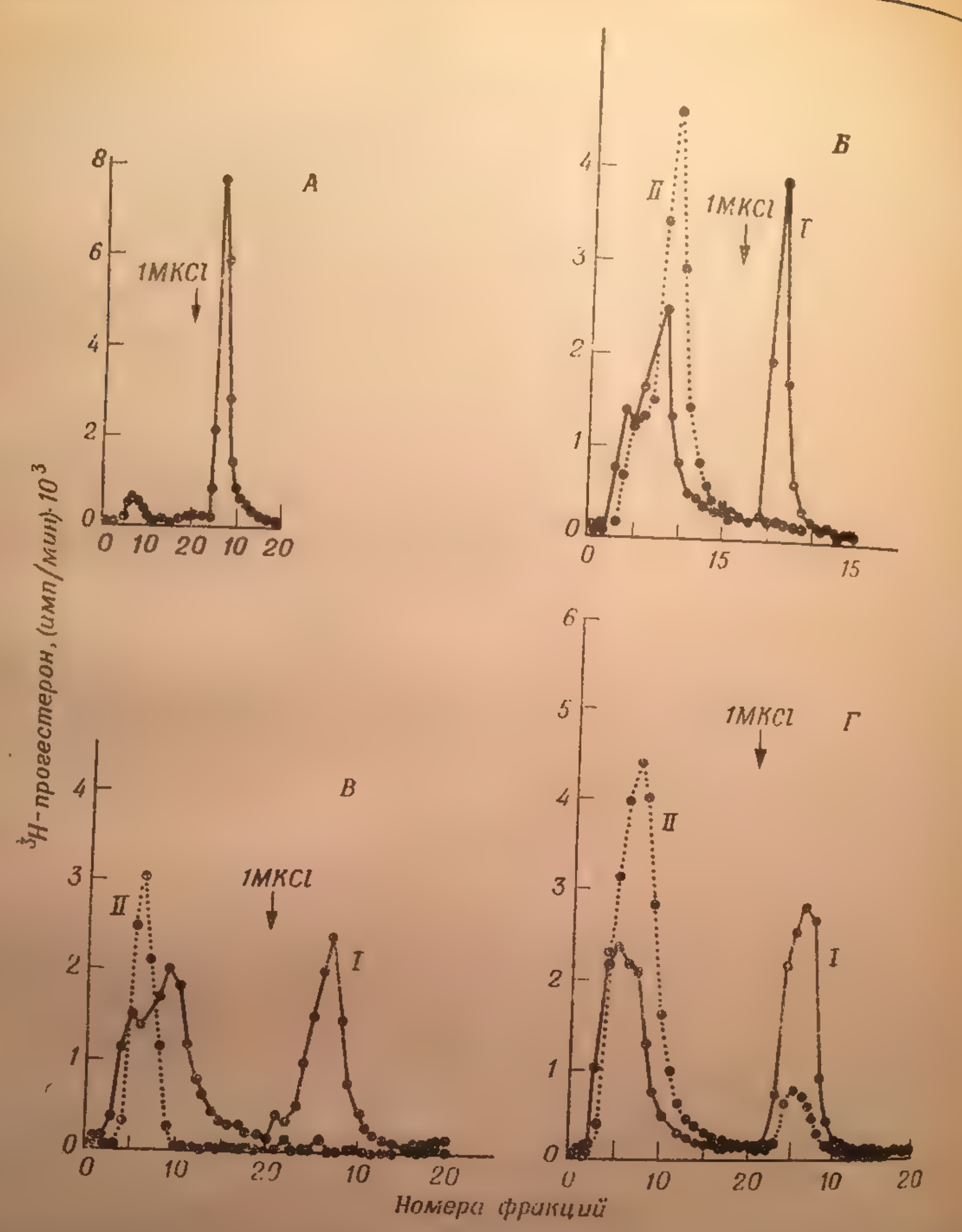



**Рис. 1.** Аффинная хроматография $^3H$-прогестерон-рецепторных комплексов яйцеводов кур-несушек на колонках АТФ-сефарозы. (Перепечатано из работы Моуджила и Тофта [65], стр. 903, с разрешения журнала Proc. Natl. Acad. Sci. USA). Аликвоты (0,2 мл) фракции рецепторов, полученной осаждением цитозоля яйцеводов несушек сульфатом аммония, инкубировали в течение 3 ч на льду с $6 \times 10^{-9}$М $^3H$-прогестерона. После этого пробы наносили на колонки АТФ-сефарозы (0,9·10,3 см). Колонки затем промывали буфером А (50 мМ *трис*-HCl, 1 мМ ЭДТА, 12 мМ тиоглицерин, 20% глицерина, pH 8), содержащим 1 М KCl. *А.* Обычная хроматография пробы, в которой 90% гормона находилось в комплексе с рецепторами. *Б.* Хроматография на одинаковых колонках контрольной пробы (*I*) и пробы, содержавшей 1000-кратный избыток немеченого прогестерона (*II*). *В.* Типичная хроматограмма, демонстрирующая соотношение концентраций $^3H$-прогестерона (*I*) и белка (*II*). Радиоактивность (имп/мин·$10^{-3}$) и концентрация белка (мг/мл) отложены на одной шкале. *Г.* Хроматография на одинаковых колонках контрольной пробы (*I*) и пробы, содержавшей 1 мМ АТФ (*II*).

сефарозе через шестичленный углеродный мостик. 1 мл сефарозы содержал приблизительно 2 мкмоль связанного АТФ.

Приведенные данные о сродстве рецепторов прогестерона яйцеводов кур к АТФ нашли подтверждение при изучении рецепторов матки коров. Цитозоль прежде всего фракционировали осаждением сульфатом аммония (35% насыщения) для отделения материала с низким молекулярным весом. Наши первые наблюдения, сделанные в этой работе, представлены на рис. 1. При пропускании препарата рецептора через колонку АТФ-сефарозы почти весь связанный $^3H$-прогестерон адсорбировался гелем. Гормон удавалось проэлюировать с колонки 1,0 М KCl (рис. 1, *А*). Следует отметить, что в этом эксперименте концентрация рецептора в препарате была относительно высокой, благодаря чему 90% $^3H$-прогестерона находилось в комплексе с белком. В большинстве последующих экспериментов связанный гормон составлял лишь 50% суммарного, что приводило к появлению значительного количества $^3H$-прогестерона, не задерживаемого на колонке (рис. 1, *Б—Г*). В некоторых опытах в рецепторных препаратах перед нанесением их на колонку определяли связывание гормона методом адсорбции на угле. После хроматографии измеряли выход общего количества $^3H$-прогестерона и меченого гормона, элюировавшегося с колонок 1 М KCl. Более 90% наносимого на колонки $^3H$-прогестерона обнаруживалось в элюате: при этом содержание $^3H$-прогестерона во фракциях, элюировавшихся 1 М KCl, составляло по меньшей мере 80% того количества гормона, которое было связано в исходном препарате.

Доказательства того, что задерживаемый АТФ-сефарозой $^3H$-прогестерон действительно находится в комплексе с рецептором, были получены в эксперименте, представленном на рис. 1, *Б*. Две пробы рецепторного препарата фракционировали на одинаковых аффинных колонках. В одну из этих проб добавляли 1000-кратный избыток немеченного прогестерона, в остальном же пробы были одинаковы. Избыток немеченного гормона должен был вытеснить $^3H$-прогестерон из комплексов с рецепторами (связывающие места которых насыщаемы). Действительно, было обнаружено, что добавление немеченого гормона приводит к практически полному удалению $^3H$-прогестерона с колонки. В дальнейших исследованиях мы установили, что несвязанный $^3H$-прогестерон не задерживается на колонке с АТФ, и что адсорбируемый меченый гормон находится в комплексе с макромолекулами, поскольку при его последующей хроматографии на колонке с сефадексом G-75 он элюировался в исключаемом объеме.

Результаты, приведенные на рис. 1, *В*, демонстрируют избирательность связывания АТФ-сефарозой: на колонке адсорбируется прогестерон-рецепторный комплекс и лишь небольшая доля суммарного белка. Колонка связывает гормон-рецепторный комплекс явно предпочтительнее других белков.

Для доказательства, что рецептор взаимодействует непосредственно с АТФ, две пробы препарата рецепторов фракционировали на одинаковых аффинных колонках, причем одна из проб содержала 1 мМ АТФ. Связывание рецепторов этой пробы с АТФ-сефарозой (концентрация нуклеотида 2 мМ) конкурентно подавлялось (рис. 1, *Г*). Добавление более высоких концентраций АТФ (выше 5 мМ) полностью блокировало связывание гормон-рецепторного комплекса с АТФ-сефарозой.

*Таблица 1*

**Влияние различных нуклеотидов на связывание $^3$H-прогрестерон-рецепторных комплексов АТФ-сефарозой [1]**

| Нуклеотид (1 мМ) | Выход связанной радиоактивности, имп/мин (I) | (II) |
|---|---|---|
| Контроль | 7660 | 10 730 |
| УТФ | 7900 | 11 880 |
| ЦТФ | 8450 | — |
| ГТФ | 8750 | — |
| АТФ | 4420 | 6 260 |
| АДФ | 7570 | 12 360 |
| АМФ | 7420 | 9 840 |
| Циклический АМФ | 8880 | 10 760 |

[1] Перепечатано из работы Мауджила и Тофта [65], стр. 904, с разрешения журнала Proc. Natl. Acad. Sci. USA.

Подобный конкурентный анализ был использован для изучения специфичности связывания нуклеотидов прогестерон-рецепторным комплексом. Условия экспериментов были идентичны описанным в подписи к рис. 1, *Г* с той лишь разницей, что к пробе рецепторов перед разделением на колонке добавляли различные нуклеотиды в концентрации 1 мМ. Связывание нуклеотидов рецепторами оценивали по способности данного нуклеотида понижать задержку $^3$H-прогестерон-рецепторного комплекса на колонке с АТФ. Результаты двух таких экспериментов приведены в табл. 1. Из исследованных нуклеотидов только АТФ оказался сильным конкурентом; при концентрации 1 мМ он уменьшал связывание рецепторов АТФ-сефарозой приблизительно на 40%. Хотя при бóльших концентрациях конкурировать могут и другие нуклеотиды, приведенные данные показывают, что связывание АТФ рецепторами прогестерона являются явно специфичным.

Хроматография на АТФ-сефарозе может служить не только очень эффективным методом изучения взаимодействия рецепторов с АТФ, но и, как это показано на рис. 1, *В*, удобной стадией очистки рецепторов. Эту процедуру можно использовать в гораздо боль-

ших масштабах без снижения специфичности и выхода. Ступенчатая элюция рецепторов 1 М KCl обычно обеспечивает более чем 25-кратную очистку с выходом 85—98%.

На рис. 2 показан профиль элюции рецепторов с колонки АТФ-сефарозы с помощью градиента концентрации KCl. Связанный прогестерон элюируется в виде одного пика при концентрации

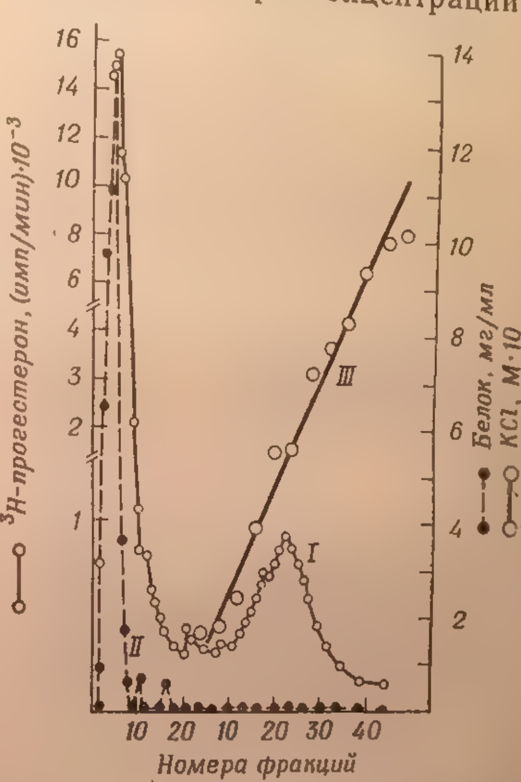



**Рис. 2.** Аффинная хроматография $^3H$-прогестерон-рецепторных комплексов яйцеводов кур-несушек на АТФ-сефарозе. Препарат цитозольных рецепторов фракционировали сульфатом аммония и инкубировали с $^3H$-прогестероном. Пробу (9 мл) наносили на 10-миллилитровую колонку со скоростью 0,2 мл/мин. Затем колонку промывали буфером А, содержащим 0,2 М KCl. Собирали 20 фракций, по 4,15 мл каждая. После этого проводили элюцию градиентом концентрации соли (0,2—1,0 М KCl) со скоростью 0,4—0,5 мл/мин. Объем собираемых фракций равнялся 1,8 мл. В аликвотах (0,1 мл) каждой фракции измеряли радиоактивность (*I*) и белок (*II*). Концентрацию KCl (*III*) определяли кондуктометрически. Для концентраций белка и KCl использована одна и та же шкала.

KCl 0,6 М. При последующем анализе этого пика на ДЭАЭ-целлюлозе было обнаружено наличие обоих рецепторных компонентов А и В. При раздельной хроматографии компонентов А и В на колонках АТФ-сефарозы оба компонента задерживались на колонках. Следовательно, рецепторные компоненты А и В не различаются по связыванию с АТФ.

Поскольку связывание рецепторов прогестерона колонкой с АТФ обратимо, казалось очевидным, что рецепторы можно проэлюировать буфером, содержащим АТФ. На рис. 3 показано удаление гормон-рецепторного комплекса с колонки ступенчатой элюцией 0,05 М АТФ. В этом эксперименте рецепторы в области их максимального выхода с колонки были очищены в 254 раза. Суммарная же очистка, достигаемая при элюции с помощью АТФ, обычно была ниже (в 25—100 раз).

Данный метод, по-видимому, в определенной степени более избирателен, чем ступенчатая элюция KCl.

С помощью центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы была проверена целостность $^3H$-прогестерон-рецепторных

комплексов после их аффинной хроматографии. До (рис. 4, *А*) и после (рис. 4, *Б*) очистки рецепторный комплекс седиментировал как 4S-единица. Хотя основная часть гормон-рецепторных комплексов и осаждалась с коэффициентом седиментации 4S в условиях как низкой, так и высокой концентрации соли (0,01 М или 0,3 М KCl), исходный материал, выделенный осаждением

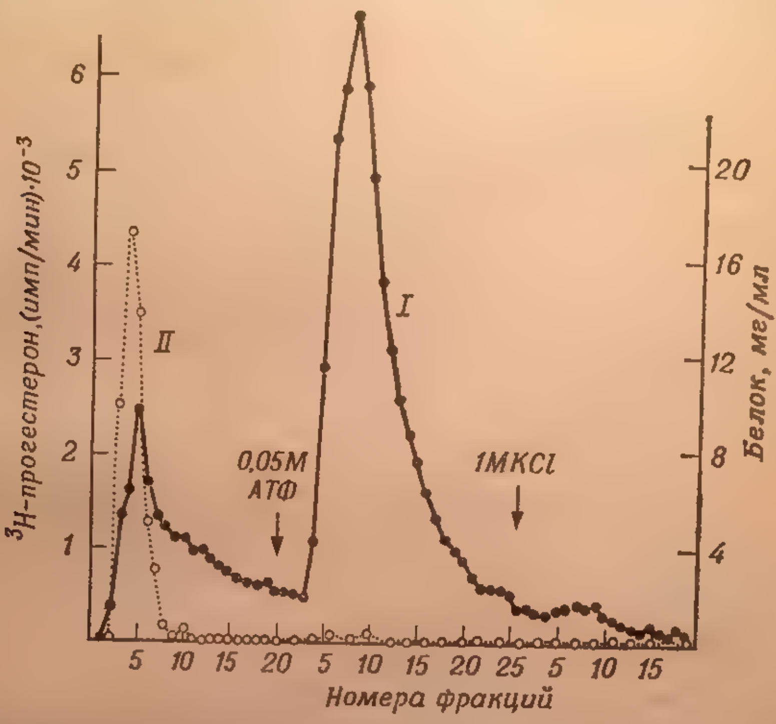



**Рис. 3.** Элюция $^3$H-прогестерон-рецепторных комплексов с колонки АТФ-сефарозы с помощью АТФ. Инкубацию пробы с радиоактивным гормоном и ее нанесение на колонку проводили, как описано в подписи к рис. 2. После промывки колонки буфером А, содержащим 0,1 М KCl, колонку промывали тем же буфером, содержащим 0,05 М АТФ. Собирали 25 фракций, по 1,81 мл каждая. Затем колонку промывали буфером А, содержащим 1 М KCl, и собирали фракции объемом по 1,81 мл. В аликвотах (0,1 мл) каждой фракции определяли содержание радиоактивности (*I*) и белка (*II*). Светлые кружки — белок; темные кружки — прогестерон.

сульфатом аммония, при низкой концентрации соли проявлял склонность к агрегации. После очистки эта склонность к агрегации исчезла. Снижение агрегации рецепторов после их очистки обнаружили также Шрейдер и О'Мэлли [38].

Физико-химические параметры взаимодействия рецепторов с АТФ сколь-нибудь детально пока не исследовались. Седиментационные свойства рецепторов при центрифугировании в градиенте концентрации сахарозы (4S) не меняются в присутствии АТФ [65]. Следовательно, АТФ не вызывает значительных изменений в структуре рецепторной молекулы. Сродство, с которым нуклеотид связывается рецептором, по-видимому, довольно высоко, поскольку такой комплекс устойчив к весьма длительному воздейст-

вию неравновесных условий хроматографии. Связывание АТФ с рецептором носит, очевидно, ионный, а не ковалентный характер, так как оно разрушается под действием высокой концентрации соли и так как рецептор можно повторно хроматографировать на АТФ-сефарозе.

Эсперименты, поставленные для решения вопроса об участии двухвалентных катионов в связывании рецепторами АТФ, носят по-

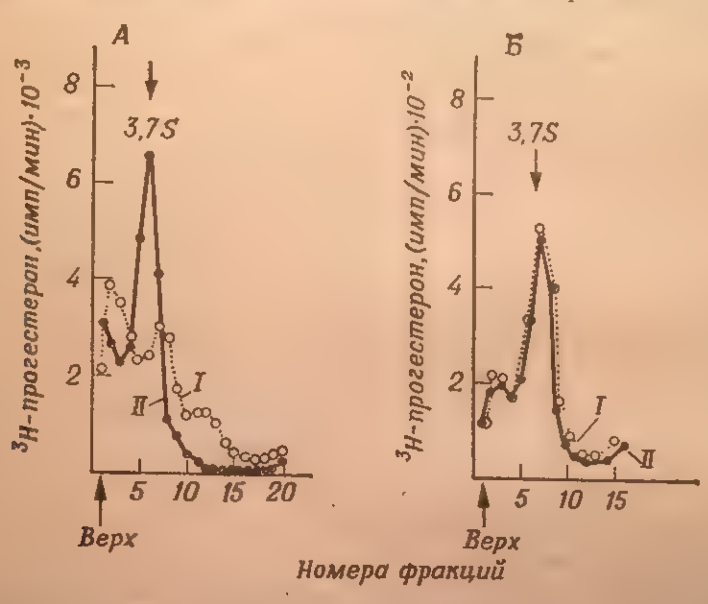



Рис. 4. Центрифугирование в градиенте концентрации сахарозы $^3$Н-прогестерон-рецепторных комплексов яйцеводов кур-несушек до и после очистки. Пробы (0,2 мл) наслаивали на 5—20%-ные градиенты сахарозы, содержащие 0,01 М (*I*) или 0,3 М (*II*) KCl. Центрифугирование проводили в течение 16 ч при 150 000 g В качестве стандарта использовали $^{14}$С-овальбумин (3,7 S). *А*. Материал до очистки. Препарат рецепторов, полученный фракционированием сульфатом аммония, инкубировали с $6 \cdot 10^{-9}$М $^3$Н-прогестерона 3 ч. *Б*. Материал из фракции, соответствующей максимуму элюции $^3$Н-прогестерон-рецепторных комплексов с колонки АТФ-сефарозы буфером А, содержащим 1М KCl. Для снижения плотности все пробы перед нанесением на градиенты разводили 3 объемами 0,01 М *трис*-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0. Светлые кружки — низкая концентрация соли; темные кружки — высокая концентрация соли.

ка лишь предварительный характер. Магний, марганец и кальций в концентрации 1—5 мМ слабо влияли на связывание рецепторов прогестерона АТФ-сефарозой. Однако это еще не доказывает, что двухвалентные катионы не играют никакой роли в связывании рецепторами АТФ. И наконец, последним пунктом в характеристике связывания рецепторами АТФ является то, что для этого связывания предварительное комплексирование рецепторов с прогестероном, по-видимому, не является обязательным (по крайней мере качественно). Количественную оценку влияния присутствия гормона на связывание АТФ пока не проводили.

В настоящее время совершенно неясно, какое влияние оказывает АТФ на функции рецепторов. При изучении клеток тимуса

Мунк и сотр. [67, 68] предположили, что АТФ облегчает превращение рецепторов глюкокортикоидов из формы, которая не связывает гормона, в форму, связывающую гормон. Наблюдавшееся нами связывание АТФ, однако, не оказывало существенного влияния ни на структуру рецепторов, ни на их способность взаимодействовать с прогестероном. На основании работы Иши и Ароноу [69] можно предположить, что АТФ способен стабилизировать комплексы глюкокортикоидов с рецепторами.

Можно было бы также рассматривать АТФ в качестве источника энергии для транслокации рецепторов из цитоплазмы в ядро [70, 71] или для истинного функционирования рецепторов в хроматине. АТФ может играть роль и эффекторной молекулы, вызывающей конформационные изменения рецепторов. Дальнейшее изучение взаимодействия рецепторов с АТФ должно, очевидно, привести к лучшему пониманию механизма действия гормонов[1].

## IV. ОЧИСТКА РЕЦЕПТОРОВ

За последние годы в очистке рецепторов достигнут значительный прогресс, и теперь уже в нескольких лабораториях осуществлено выделение рецепторов эстрогенов и прогестерона [43, 72—74]. Шрейдер [75] описал несколько удобных методов очистки, которые можно использовать применительно к рецепторам прогестерона птиц. Обычно первой стадией очистки является осаждение цитозольных рецепторов сульфатом аммония (30—35% насыщения). Данная процедура, как правило, обеспечивает очистку рецепторов в 20—30 раз с хорошим выходом. Эту фракцию можно затем хроматографировать на ДЭАЭ-целлюлозе, фосфоцеллюлозе или гидроксилапатите. Рецепторы принадлежат к тем немногим белкам, которые обладают существенным сродством и к ДЭАЭ-целлюлозе, и к фосфоцеллюлозе. Хотя рецепторы являются кислыми белками, их молекулы, очевидно, содержат основные участки, способные взаимодействовать с фосфоцеллюлозой. Комбинацией хроматографических методов удалось очистить рецепторы прогестерона по крайней мере в несколько сот раз. Эти методы оказались особенно удачными в отношении формы В рецепторов, которая связывается ДЭАЭ-целлюлозой и гидроксилапатитом более прочно, чем форма А. Недавно появилось сообщение об очистке подобными методами формы В рецепторов до состояния, являющегося, по всей видимости, гомогенным [76].

Как было показано в предыдущем разделе, аффинная хроматография с использованием АТФ-сефарозы представляет собой другой очень эффективный способ очистки. Этот метод можно приме-

---

[1] Впоследствии этой группой авторов было показано, что форма В прогестиновых рецепторов яйцеводов кур катализирует обмен фосфатных остатков между АТФ и пирофосфатом (Mougil V., Toft D., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1976, v. 73, № 10, 3443—3447). — *Прим. ред.*

нить, либо включив в последовательность из одной или нескольких хроматографических процедур, упомянутых выше, либо в качестве заключительной стадии после описанной ниже аффинной хроматографии на матриксе с иммобилизованным стероидом.

Использование для очистки рецепторов аффинной хроматографии на матриксе с иммобилизованным стероидом привело к определенным успехам [43]. Некоторые трудности в использовании этого метода в целом были преодолены в работе Сика и др. [73], выполненной на рецепторах эстрогенов. Очень важно соблюдать три следующих условия: а) правильный выбор участка стероидной молекулы для прикрепления к материалу колонки; б) полная отмывка матрикса с иммобилизованным стероидом от свободного стероида; в) подбор оптимальных условий для элюции прочно связанного рецептора. Последнее условие может быть выполнено за счет непродолжительной инкубации аффинного матрикса в присутствии высокой концентрации свободного гормона при повышенной температуре. Такая процедура дает возможность рецептору перейти из комплекса со стероидом, связанным с матриксом, в комплекс со свободным гормоном, используемым для элюции.

Аффинная хроматография на матриксе с иммобилизованным стероидом была недавно использована Куном и др. [43] для очистки рецепторов прогестерона птиц. Аффинный матрикс получали присоединением дезоксикортикостерона к бычьему сывороточному альбумину, который в свою очередь присоединялся к сефарозе-4В. Поскольку рецепторы прогестерона обладают высоким сродством к дезоксикортикостерону, они могли избирательно адсорбироваться аффинным матриксом. Рецепторы элюировали, суспендируя матрикс в течение 1 ч при комнатной температуре в растворе, содержащем свободный прогестерон. Использование лишь одной этой процедуры дало по крайней мере 2000-кратную очистку рецепторов с выходом приблизительно 15%. Дополнительная хроматографическая процедура с использованием ДЭАЭ-сефадекса позволила достичь 4000-кратной очистки. Очищенный препарат содержал обе формы рецепторов, А и В. Молекулы рецепторов в полученных препаратах, судя по их размерам, способности связывать стероиды и взаимодействию с изолированными ядрами, повидимому, идентичны молекулам рецепторов в неочищенных препаратах.

Приведенные выше данные по многократной очистке рецепторов являются самыми последними достижениями лишь немногих лабораторий. Однако путь для использования очищенных рецепторов многими лабораториями теперь открыт. В прошлом очистка рецепторов представляла собой трудную проблему, служившую главным камнем преткновения в биохимических исследованиях гормонального действия. Работа с очищенными препаратами должна в ближайшие годы дать необходимую информацию о физико-химических свойствах рецепторных белков.

## V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на наблюдаемый сейчас значительный прогресс в химии гормональных рецепторов, биохимические механизмы гормон-рецепторного действия остаются неясными. По-видимому, эта неясность сохранится до тех пор, пока не будет воспроизведен в бесклеточной системе весь спектр гормон-рецепторной активности. Как обсуждалось в разд. III, бесклеточные системы используются в настоящее время для изучения связывания гормон-рецепторных комплексов изолированными компонентами ядра. Так, Спелсберг и др. [77] недавно сообщили о получении высокоочищенной фракции кислых белков хроматина, которая, по-видимому, принимает участие в связывании прогрестерон-рецепторного комплекса. Биологическое значение результатов исследований связывания в бесклеточных системах, однако, неоднократно подвергалось сомнению [60, 78, 79]. Вероятно, сомнение будет оставаться в силе до тех пор, пока биологическая функция рецепторного комплекса не будет выявлена in vitro. О'Мэлли [80] сообщил предварительные данные о том, что прогрестерон-рецепторный комплекс при добавлении к изолированному хроматину усиливает инициацию синтеза РНК РНК-полимеразой. Не исключено, что в основе наблюдавшегося ранее феномена стимуляции синтеза РНК в изолированных ядрах под действием комплексов рецепторов с эстрогенами и андрогенами [81—84] также лежит усиление инициации. В настоящее время подобные результаты следует воспринимать с осторожностью, поскольку используемые в таких исследованиях системы чрезвычайно сложны и пока не изучены в достаточной степени. Тем не менее эти данные вселяют надежду, что применение биохимических подходов в исследованиях in vitro позволит полностью раскрыть механизм действия стероидных гормонов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *O'Malley B. W., Means A. R.*, Science, *183*, 610 (1974).
2. *Spelsberg T. C., Toft D. O.*, in: Receptors and Mechanisms of Action of Steroid Hormones (J. R. Pasqualini, ed.), Marcel Dekker, New York, в печати.
3. *O'Malley B. W., McGuire W. L., Kohler P. O., Korenman S. G.*, Recent Prog. Horm. Res., *25*, 105 (1969).
4. O'Malley *B. W., Sherman M. R., Toft D. O.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *67*, 501 (1970).
5. *Sherman M. R., Corvol P. L., O'Malley B. W.*, J. Biol. Chem., *245*, 6085 (1970).
6. *O'Malley B. W., Toft D. O., Sherman M. R.*, J. Biol. Chem., *246*, 1117 (1971).
7. *Strott C. A.*, Endocrinology, *95*, 826 (1974).
8. *Schrader W. T., Toft D. O., O'Malley B. W.*, J. Biol. Chem., *247*, 2401 (1972).
9. *Shyamala G., Gorski J.*, J. Cell Biol., *35*, 125A (1967).
10. *Jensen E. V., Suzuki T., Kawashima T., Stumpf W. E., Jungblut P. W., De*Sombre E. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *59*, 632 (1968).
11. *Shyamala G., Gorski J.*, J. Biol. Chem., *244*, 1097 (1969).
12. *Spelsberg T. C., Steggles A. W., O'Malley B. W.*, J. Biol. Chem., *246*, 4188 (1971).
13. *Feil P. D., Glasser S. R., Toft D. O., O'Malley B. W.*, Endocrinology, *91*, 738 (1972).

14. *Philibert D., Raynaud J. R.*, Steroids, *22*, 89 (1973).
15. *Falk R. J., Bardin C. W.*, Endocrinology, *86*, 1059 (1970).
16. *Milgrom E., Perrot M., Atger M., Baulieu E.-E.*, Endocrinology, *90*, 1064 (1972).
17. *Milgrom E., Atger M., Perrot M., Baulieu E.-E.*, Endocrinology, *90*, 1071 (1972).
18. *Faber L. E., Sandmann M. L., Stavely H. E.*, J. Biol. Chem., *247*, 8000 (1972).
19. *Freifeld M. L., Feil P. D., Bardin C. W.*, Steroids, *23*, 93 (1974).
20. *Philibert D., Raynaud J. P.*, Endocrinology, *94*, 627 (1974).
21. *Pao B. R., Wiest W. G., Allen W. M.*, Endocrinology, *92*, 1229 (1973).
22. *Faber L. E., Sandmann M. L., Stavely H. E.*, Endocrinology, *93*, 74 (1973).
23. *McGuire J. L., DeDella C.*, Endocrinology, *88*, 1099 (1971).
24. *Leavitt W. W., Toft D. O., Strott C. A., O'Malley B. W.*, Endocrinology, *94*, 1041 (1974).
25. *Kontula K., Jänne O., Luukkainen T., Vihko R.*, Biochim. Biophys. Acta, *328*, 145 (1973).
26. *Smith H. E., Smith R. G., Toft D. O., Neergaard J. R., Burrows E. P., O'Malley B. W.*, J. Biol. Chem., *249*, 5924 (1974).
27. *Verma L U., Laumas K. R.*, Biochim. Biophys. Acta, *317*, 403 (1973).
28. *Rao B. R., Wiest W. G., Allan W. M.*, Endocrinology, *95*, 1275 (1974).
29. Corvol P., *Falk Freifeld M. L., Bardin C. W.*, Endocrinology, *90*, 1464 (1972).
29. *Corvol P., Falk R., Freifeld M. L., Bardin C. W.*, Endocrinology, *90*, 1464 (1972).
30. *McGuire J. L., Bariso C. D., Shroff A. P.*, Biochemistry, *13*, 319 (1974).
31. *Kontula K., Jänne O., Rajakoski E., Tanhuanpää E., Vihko R.*, J. Steroid Biochem., *5*, 39 (1974).
32. *Milgrom E., Thi L., Atger M., Baulieu E.-E.*, J. Biol. Chem., *248*, 6366 (1973).
33. *Feil P. D., Bardin C. W.*, 55th Annual Meeting of the Endocrine Society, Chicago, Ill., 1973, Abstr. 277.
34. *Stumpf W. E., Sar M.*, J. Steroid Biochem., *4*, 477 (1973).
35. *Warembourg M.*, Endocrinology, *94*, 665 (1974).
36. *Toft D. O., O'Malley B. W.*, Endocrinology, *90*, 1041 (1972).
37. *Sherman M. R., Atienza S. B. P., Shansky J. R., Hoffman L. M.*, J. Biol. Chem., *249*, 5351 (1974).
38. *Schrader W. T., O'Malley B. W.*, J. Biol. Chem., *247*, 51 (1972).
39. *Kontula K., Jänne O., Vihko R., de Jager E., de Visser J., Zeelen F.*, Acta Endocrinol. (Kbh.), *78*, 574 (1975).
40. *Schrader W. T., Heuer S. S., O'Malley B. W.*, Biol. Reprod., *12*, 134 (1975).
41. *Stancel G. M., Leung K. M. T., Gorski J.*, Biochemistry, *12*, 2137 (1973).
42. *Jensen E. V., DeSombre E. R.*, Annu. Rev. Biochem., *41*, 203 (1972).
43. *Kuhn R. W., Schrader W. T., Smith R. G., O'Malley B. W.*, J. Chem., *250*, 4220 (1975).
44. *Puca G. A., Nola E., Sica V., Bresciani F.*, Biochemistry, *11*, 4157 (1972).
45. *Erdos T., Fries J.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *58*, 932 (1974).
46. *Smith R. G., Iramain C. A., Buttram V. C., O'Malley B. W.*, Nature, *253*, 271 (1975).
47. *Davies I. J., Challis J. R. G., Ryan K. J.*, Endocrinology, *95*, 165 (1974).
48. *O'Malley B. W., Schrader W. T., Spelsberg T. C.*, Adv. Exp. Med. Biol., *36*, 174—196 (1973).
49. *Steggles A. W., Spelsberg T. C., O'Malley B. W.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *43*, 20 (1971).
50. *Spelsberg T. C., Steggles A. W., Chytil F., O'Malley B. W.*, J. Biol. Chem., *247*, 1368 (1972).
51. *Buller R. E., Toft D. O., Schrader W. T., O'Malley B. W.*, J. Biol. Chem., *250*, 801 (1975).
52. *Buller R. E., Schrader W. T., O'Malley B. W.*, J. Biol. Chem., *250*, 809 (1975).
53. *Chamness G. C., Jennings A. W., McGuire W. L.*, Biochemistry, *13*, 327 (1974).
54. *Gschwendt M., Hamilton T. H.*, Biochem. J., *128*, 611 (1972).
55. *Jensen E. V., Mohla S., Orell T., Tanaka S., DeSombre E. R.*, J. Steroid Biochem., *3*, 445 (1972).
56. *Musliner T. A., Chader G. J., Villee C. A.*, Biochemistry, *9*, 4448 (1970).

57. *Baulieu E.-E., Jung I., Glondau J. P., Robel P.*, Adv. Biosci., 7, 179—191 (1971).
58. *Fang S., Anderson K. M., Liao S.*, J. Biol. Chem., *244*, 6584 (1969).
59. *Rennie P., Bruchovsky N.*, J. Biol. Chem., *247*, 1546 (1972).
60. *Higgins S. J., Rousseau G. G., Baxter J. D., Tomkins G. M.*, J. Biol. Chem., *248*, 5866 (1973).
61. *Milgrom E., Atger M., Baulieu E.-E.*, Biochemistry, *12*, 5198 (1973).
62. *Watanabe H., Orth D. N., Toft D. O.*, Biochemistry, *13*, 332 (1974).
63. *Marver D., Goodman D., Edelman I. S.*, Kidney Int., *1*, 210 (1972).
64. *Notides A. C., Nielson S.*, J. Biol. Chem., *249*, 1866 (1974).
65. *Moudgil V. K., Toft D. O.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *72*, 901 (1975).
66. *Lamed R., Levin Y., Wilcheck M.*, Biochim. Biophys. Acta, *304*, 231 (1973).
67. *Munck A., Brinck-Johnsen T.*, J. Biol. Chem., *243*, 5556 (1968).
68. *Bell P. A., Munck A.*, Biochem. J., *136*, 97 (1973).
69. *Ishii D. N., Aronow L.*, J. Steroid Biochem., *4*, 593 (1973).
70. *O'Malley B. W.*, Metabolism, *20*, 981 (1971).
71. *Jensen E. V., DeSombre E. R.*, Science, *182*, 126 (1973).
72. *DeSombre E. R., Chabaud J. P., Puca G. A., Jensen E. V.*, J. Steroid Biochem., *2*, 95 (1971).
73. *Sica V., Nola E., Parikh I., Puca G. A., Cuatracasas P.*, J. Biol. Chem., *248*, 6543 (1973).
74. *Schrader W. T., Buller R. E., Kuhn R. W., O'Malley B. W.*, J. Steroid Biochem., *5*, 989 (1974).
75. *Schrader W. T.*, Methods Enzymol., *36A*, 187—211 (1974).
76. *Kuhn R. W, Schrader W. T., O'Malley B. W.*, Fed. Proc., *34*, 627 Abstr. 2311 (1975).
77. *Spelsberg T. C., Webster R., Pikler G. M.*, in: Florida Colloquium on Molecular Biology (G. Stein, J. Stein and L. Kleinsmith, eds.), Academic Press, New York, 1975.
78. *Chamness G. C., Jennings A. W., McGuire W. L.*, Nature, *241*, 458 (1973).
79. *Chamness G. C., Jennings A. W., McGuire W. L.*, Biochemistry, *13*, 327 (1974).
80. *O'Malley B. W.*, 59th Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology, Atlantic City, N. J., 1975.
81. *Raynaud-Jammet C., Bautieu E. E.*, C. R. Acad. Sci. [D], *268*, 3211 (1969).
82. *Arnaud M., Beziat Y., Gilleux J. C., Hough A., Hough D., Monsseron-Canet*, Biophys. Acta, *232*, 117 (1971).
83. *Mohla S., DeSombre E. R., Jensen E. V.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *46*, 661 (1972).
84. *Davies P., Griffiths K.*, Biochem. J., *136*, 611 (1973).

# Глава 12

# РЕЦЕПТОРЫ ГОРМОНОВ В ОПУХОЛЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

*В. МАК-ГАЙР, Г. ЧАМНЕСС, М. КОСТЛОУ И К. ГОРВИЦ*

Department of Medicine
The University of Texas Health Science Center
San Antonio, Texas

## I. ВВЕДЕНИЕ

Молочные железы человека чувствительны к действию многих гормонов, причем наиболее выраженное влияние оказывают, пожалуй, эстрогены и пролактин. Есть все основания думать, что гормональный контроль может сохраняться и по отношению к опухолям, возникающим при злокачественном перерождении клеток молочной железы. Первое прямое доказательство существования гормонального контроля развития рака молочной железы было получено 79 лет назад, когда регрессию метастазирующих опухолей удалось вызвать с помощью овариэктомии [1]. К сожалению, лишь в 30% случаев опухоли чувствительны к овариэктомии. Бóльшая часть таких опухолей сходным образом реагирует также и на адреналэктомию или гипофизэктомию [2]. Поэтому трудно определить, какие же именно гормоны являются первичной причиной роста опухоли. Вследствие этого такие чувствительные к гормонам опухоли называют просто «гормонозависимыми».

Любая нормальная ткань-мишень содержит специфические рецепторы для соответствующего гормона: для стероидов это цитоплазматические белки, для полипептидов — рецепторы клеточной поверхности. В гормонозависимых опухолях также имеются рецепторы, в то время как гормононезависимые, или автономные, опухоли, по последним данным, часто бывают лишены рецепторов [3].

Эти данные, которые мы обсудим подробно в ходе дальнейшего изложения, легли в основу следующих гипотез:

1. Нормальные клетки молочной железы содержат цитоплазматические или мембранные рецепторные участки для каждого из гормонов, влияющих на рост и функционирование молочных желез. Эти рецепторные участки обеспечивают первичное взаимодействие гормона с клеткой и запускают цепь биохимических реакций, характерных для данного гормона.

2. В процессе злокачественного перерождения клетки в ней может сохраниться либо вся, либо только часть популяции рецепторных связывающих мест нормальной клетки. Если клетка сохраняет рецепторные места связывания, то ее рост и функционирование, так же как рост и функционирование нормальной клетки, могут регулироваться гормонами. Если вследствие злокачественного перерождения клетка теряет рецепторы, то такая клетка перестает опознаваться циркулирующими гормонами как клетка-мишень, и, следовательно, эндокринный контроль оказывается утраченным.

3. Наличие специфических рецепторов в опухолевой ткани молочной железы может, таким образом, указывать на ее зависимость от гормонов. Этот признак помогает выявить именно те 30% больных раком молочных желез, которым эндокринная терапия действительно полезна.

Рассмотрим теперь в отдельности каждый из тех полипептидных и стероидных гормонов, о которых известно, что они влияют на рост рака молочной железы. Мы попытаемся разобраться в механизмах, при помощи которых действуют эти гормоны, а в тех случаях, когда это будет возможно, постараемся выявить патофизиологические корреляции. Хотя определенные данные относительно опухолей молочной железы человека уже получены и мы их рассмотрим, однако бо́льшая часть исследований, посвященных гормонозависимым карциномам молочной железы, выполнена на животных. В качестве моделей таких карцином особенно широкое распространение получили индуцируемые канцерогенами опухоли молочной железы крыс, подвергающиеся регрессии после удаления эндокринных органов. Методы индукции и удаления таких опухолей, их гистология, эндокринологические аспекты и различные ферментативные системы подробно обсуждаются в специальных обзорах [4—9]. Удобными моделями для изучения эндокринологии рака служат также некоторые линии трансплантируемых опухолей молочной железы крыс [10—12].

## II. ПРОЛАКТИН

### А. Опухоли молочной железы крыс

Из гормонов, влияющих на рост опухолей молочной железы, пролактин, по-видимому, является наиболее важным. Это заключение основывается на следующих фактах [13—14]:

1. Пролактин сам по себе может усиливать (по крайней мере на короткое время) рост опухолей молочной железы в условиях, когда удалены яичники, надпочечники и гипофиз [15, 16].

2. Введение транквилизатора перфеназина, стимулирующего секрецию пролактина, приводит к увеличению числа

и размеров опухолей у адренал- и овариэктомированных крыс [15].

3. Ежедневное введение антисыворотки к пролактину приводит к регрессии опухолей у 50% крыс с индуцированными диметилбензантраценом (ДМБА) опухолями. В то же время введение таким животным нормальной сыворотки кролика приводит к регрессии опухолей лишь в 13% случаев [17]. Сходные результаты были получены с антисывороткой к аденогипофизу [18].

4. Алкалоиды спорыньи подавляют секрецию пролактина, действуя, возможно, прямо на гипофиз и на гипоталамус [19, 20]. Алкалоиды спорыньи подавляют рост индуцированных ДМБА [21—23] и спонтанных опухолей крыс [24]. В 62% таких случаев наблюдалась полная ремиссия; большинство опухолей, подвергшихся регрессии, не возобновляли роста после прекращения лечения [25]. Было показано, что комбинированное введение эргокорнина и резерпина (которое, как известно, вызывает пангипопитуитаризм) столь же эффективно для стимуляции ремиссии опухолей, индуцированных ДМБА, как и гипофизэктомия [26]. Имеется прекрасный обзор по действию алкалоидов спорыньи на секрецию пролактина и зависимые от пролактина процессы [27].

5. Повреждения срединного возвышения серого бугра приводят к стимуляции выделения пролактина и подавлению выделения других гипофизарных гормонов [28]. В результате таких повреждений происходит значительное увеличение размеров и числа индуцированных ДМБА опухолей [29, 30]. Имплантация эстрадиолбензоата в срединное возвышение крыс-опухоленосителей вызывает повышение по сравнению с контролем содержания пролактина в крови и значительно увеличивает размеры и количество опухолей [31]. Данные об этих эффектах пролактина собраны в специальном обзоре [32].

Несмотря на основательность вышеперечисленных аргументов, свидетельствующих о важной роли пролактина в стимуляции роста индуцированных ДМБА опухолей, результаты других экспериментов дают основание думать, что пролактин — не единственный гормон, к которому опухоли чувствительны. Во-первых, если у крыс с индуцированными ДМБА опухолями одновременно и удалить яичники, и повредить срединное возвышение для повышения выделения пролактина, то опухоли растут ускоренными темпами лишь в первые 10—12 дней. Затем опухоли подвергаются регрессии, даже несмотря на то, что содержание пролактина остается повышенным [29, 33]. Фактор яичников, поддерживающий в этих условиях рост опухоли, не был идентифицирован. Во-вторых, рост экспериментальных опухолей стимулируется беременностью [34—36], а роды и прекращение вскармливания грудью,

наоборот, сопровождаются регрессией значительного количества таких опухолей. Поскольку поддержание размеров опухоли или ее рост в период лактации зависит от стимулов, возникающих при сосании, а предотвращение вскармливания грудью приводит к регрессии опухолей [37, 38], то эффект этот обусловлен, как будто, пролактином. Однако на самом деле все гораздо сложнее, поскольку овариэктомия блокирует стимулирующее действие эндогенного или экзогенного пролактина на рост опухоли, а введение животным прогестерона снимает такой блок [37]. Эти данные можно было бы объяснить просто тем, что стимуляция пролактином роста опухоли в подобных условиях зависит от прогестерона, однако прямых доказательств этому нет.

## Б. Рак молочной железы человека

Исследования, проведенные на опухолях животных, показали, что простым повышением или понижением содержания пролактина в плазме нельзя полностью объяснить рост и регрессию опухолей молочной железы. Это заключение подкрепляется результатами исследований, проведенных на людях.

Физиологические данные, указывавшие на то, что пролактин представляет собой соединение, отличное от гормона роста, были получены уже давно [40], однако окончательно доказать это положение удалось лишь в последнее время [39]. Не остается сомнений в том, что гипофизэктомия приводит к объективной регрессии метастазов опухоли молочной железы [41]. Это можно было бы объяснить следующими причинами: в результате гипофизэктомии опухоль лишается влияния пролактина и (или) гормона роста, которые, возможно, непосредственно поддерживают ее рост; после удаления гипофиза исчезают гонадотропины, что приводит к снижению образования эстрогенов и прогестерона в яичниках; из-за потери адренокортикотропина в надпочечниках снижается синтез предшественников эстрогенов, а также прогестерона и глюкокортикоидов. Ранние попытки разобраться в этом вопросе привели к противоречивым результатам. Пирсон и др. [42—44] сопоставили степень гиперкальциурии со скоростью роста остеолитических метастазов у больных раком молочной железы [42]. Используя выявленную корреляцию как показатель гормональной стимуляции опухолевого роста, авторы установили, что гормон роста быка [43] и человека [44] стимулирует развитие метастазирующей карциномы молочной железы. Это заключение не получило подтверждения в работе Липсетта и Бергенсталя [45], показавших, что ни гормон роста человека, ни пролактин овец не увеличивают экскреции кальция у больных раком молочной железы по сравнению с уровнем экскреции в контрольной группе больных. Обе группы исследователей [44, 45] обратили внимание на следующий важный факт: после гипофизэктомии фармакотерапия эстрогенами или

андрогенами не вызывает дальнейшей ремиссии рака молочной железы. Более того, физиологические дозы эстрогенов не осложняют хода болезни у тех пациентов, у которых в результате гипофизэктомии наблюдался процесс ремиссии. Полученные результаты можно рассматривать как доказательства определяющего значения гипофиза для роста опухолей молочной железы человека и их чувствительности к эндокринной терапии.

В дальнейших исследованиях для выяснения роли пролактина была использована способность L-ДОФА понижать содержание пролактина в крови [46—48]. Рядом исследователей L-ДОФА вводился больным метастазирующим раком молочных желез; полученные при этом результаты были различны [49—54]. Большинство авторов сходится на том, что L-ДОФА способен резко снижать содержание пролактина; во многих случаях наблюдается также облегчение болей в костях у больных с костными метастазами. Объективная же регрессия, однако, происходит нечасто, что, возможно, обусловлено неполным или временным характером подавления секреции пролактина. Было выдвинуто предположение, что облегчение болей в костях в результате терапии L-ДОФА может быть использовано в качестве простого теста для выявления тех больных, которым показано оперативное эндокринное лечение. Это предположение не было пока проверено на статистически достоверном материале с надежным контролем.

Содержание пролактина у людей снижают также активные соединения спорыньи [55, 56]. К сожалению, объективная регрессия опухолей под действием этих веществ наблюдается редко [57—59].

Возможность того, что содержание пролактина в крови у больных раком молочной железы может быть повышенным, отвергнута по крайней мере в четырех работах [60—63]. Тем не менее одна группа авторов сообщила о повышенном содержании пролактина у членов семей с высокой частотой заболевания раком молочной железы [62]. Сообщалось также, что у женщин, принимающих резерпин (который, как известно, стимулирует секрецию пролактина у человека), случаи заболевания раком молочной железы наблюдаются чаще, чем в норме [64—66]. Следует отметить, что максимум секреции пролактина приходится на ночь [67, 68], так что случайные измерения содержания пролактина в дневное время в группах больных с подозреваемым или уже обнаруженным раком молочной железы не имеют особой ценности.

И наконец, наиболее важным аргументом против концепции о первичной роли пролактина в росте рака молочной железы человека является одновременное повышение содержания пролактина и регрессия опухоли после перерезки ножки гипофиза. Эни и Эклс [69] отметили, что у четырех больных, подвергшихся операции перерезки ножки гипофиза по поводу метастазирующего рака молочной железы, после операции возникло отделение мо-

лока. И в то же самое время у всех этих больных наблюдались определенные признаки объективной регрессии опухоли. Много позднее эти важные клинические наблюдения нашли подтверждение при непосредственном измерении содержания пролактина в плазме больных с перерезанной ножкой гипофиза по поводу метастазирующего рака молочной железы [70]. У 8 из 11 таких больных наблюдалась ремиссия, которая длилась от 7 мес до 12 лет. У 5 из этих пациентов в период ремиссии содержание пролактина было повышенным. Содержание пролактина было также повышенным у двух из тех трех больных, объективная ремиссия у которых не отмечалась. Таким образом, результаты выключения функций эндокринных желез у людей, как и данные модельных экспериментов на животных, свидетельствуют о том, что биохимические механизмы регрессии опухолей молочной железы после таких воздействий включают в себя не только изменение содержания пролактина в крови.

### В. Механизм чувствительности к пролактину

Утверждения о том, что пролактин является единственным гормоном, к которому чувствительны гормонозависимые опухоли, являются, вероятно, преувеличением; тем не менее значение пролактина в стимуляции множества биохимических процессов в молочных железах не подлежит сомнению. Эти процессы особенно интенсивно изучались на органной культуре; полученные результаты недавно были суммированы в специальном обзоре [71]. Четкого объяснения феномему гормональной зависимости, однако, эти результаты не дают.

Другие полипептидные гормоны гипофиза действуют на соответствующие клетки-мишени, связываясь с рецепторами поверхностной мембраны. Это взаимодействие запускает цепь событий, включающих образование циклического АМФ и активацию протеинкиназы, что в конечном итоге определяет выполнение чувствительной клеткой специфической функции [72]. Можно было предположить, что и на клетках молочной железы имеются специфические рецепторные участки для распознавания пролактина. Доказательства в пользу этой концепции были получены Тёркингтоном [73]. Этот исследователь обнаружил, что ковалентно присоединенный к сефарозе пролактин, который в принципе не мог попадать в клетку, был тем не менее способен стимулировать синтез РНК в изолированных клетках молочной железы. С помощью радиоавтографии было показано, что после введения радиоактивного пролактина кроликам, мышам и крысам меченый гормон локализуется на поверхности клеток молочной железы и других чувствительных тканей [74—75]. Проведены также прямые измерения связывания $^{125}$I-пролактина с мембранными частицами молочной железы кроликов и мышей [76—79].

Эти данные свидетельствуют о том, что гормональная зависимость или автономность раковых клеток молочной железы определяется наличием или отсутствием рецепторов: гормонозависимые опухолевые клетки, подобно нормальным клеткам молочной железы, сохраняют поверхностно расположенные рецепторы, тогда как автономные клетки теряют рецепторы, а следовательно, и способность узнавать пролактин и отвечать на его действие. Правомочность этого допущения мы проверили путем сравнения содержания рецепторов пролактина в нормальной молочной железе крыс и в гормонозависимых и автономных опухолях молочной железы этих животных.

Первоначально, для того чтобы избежать проблем, связанных с очисткой мембран, мы определяли связывание $^{125}$I-пролактина в срезах ткани. В лактирующей молочной железе мы обнаружили насыщаемое связывание гормона с высоким сродством ($K_d = 2 \times 10^{-9}$ М); на клетку приходится приблизительно 3000 рецепторных участков для пролактина. Из всех изученных нерадиоактивных гормонов лишь крысиный и овечий пролактин конкурировали за связывающие участки [80].

После этого мы исследовали две линии трансплантируемой карциномы молочной железы MTW9. Одна из этих линий, MTW9-MD, растет у интактных крыс, но быстро регрессирует после удаления яичников. Содержание рецепторов пролактина в этой опухоли было таким же, как и в нормальной молочной железе. В этой опухоли имелись также значительные количества рецепторных мест связывания для эстрогенов. Напротив, в автономной линии MTW9-MA, растущей и у гипофизэктомированных, и у овариэктомированных крыс, количество рецепторов пролактина и эстрогенов составляло лишь одну шестую от обнаруженного в гормонозависимой опухоли [81]. Эти данные показывают, что рецепторы пролактина могут и сохраняться, и теряться в процессе злокачественного перерождения и последующего роста опухоли молочной железы. Более того, потеря рецепторных мест связывания для пролактина, по-видимому, связана с исчезновением гормонозависимости [82].

Недавно проведенные эксперименты показали, что пролактин повышает захват эстрадиола тканью молочной железы in vitro [83]. Эти данные дают основание думать, что процессы исчезновения рецепторов пролактина и рецепторов эстрогенов в опухоли MTW9-MA могут быть взаимосвязанными. Виньон и Рошфор [84], кроме того, обнаружили, что в период вызванной удалением яичников регрессии индуцированных ДМБА опухолей в этих опухолях происходит быстрое падение содержания рецепторных мест связывания для эстрогенов. Введение пролактина при этом приводило не только к возобновлению роста опухоли, но и к восстановлению в ней концентрации рецепторов эстрогенов. Не ясно, однако, действует ли пролактин на синтез эстрогенных рецепторов специфи-

чески или же это действие обусловлено прекращением регрессии опухоли, что обеспечивает выживание и рост клеток, содержащих рецепторы эстрогенов.

Хотя и мы, и другие авторы [81, 82, 85] предполагали существование причинной связи между исчезновением рецепторов пролактина и исчезновением гормональной зависимости в экспериментальной опухоли молочной железы, ситуация усложняется следующим наблюдением. Трансплантируемая карцинома молочной железы крыс R3230AC хорошо растет у овариэктомированных самок крыс, вследствие чего считается автономной. В то же время эта опухоль способна реагировать на действие пролактина синтезом ферментов, которые, как считается, связаны с образованием белка молока [85—87]. В этой опухоли мы обнаружили нормальное содержание рецепторных мест связывания для пролактина [80]. Ясно, что автономность в некоторых случаях имеет место даже при сохранении рецепторов пролактина и чувствительности к этому гормону. Автономность карциномы R3230AC, возможно, обусловлена значительно более низким содержанием в ней рецепторов эстрогенов по сравнению с гормонозависимыми опухолями [88, 89]. Позднее мы разберем это допущение подробнее.

Наконец, не исключено, что в некоторых случаях злокачественное перерождение приводит к активации на поверхности клеток молочной железы рецепторов иного типа, в нормальных условиях не выявляемых. Это могло бы приводить к появлению чувствительности опухолевых клеток к действию гормонов, не влияющих на нормальную ткань молочной железы. В этом случае опухоли могли бы не отвечать на изменения содержания пролактина и казались бы поэтому автономными. В действительности же они оставались бы зависимыми, но уже от других гормонов, а содержание рецепторов пролактина было бы уже не столь важно. Такая ситуация действительно имеет место в случае некоторых опухолей надпочечников [90].

## III. ЭСТРОГЕНЫ

На нормальную молочную железу эстрогены способны действовать прямо, вызывая ее рост и дифференцировку [91—94]. С другой стороны, эстрогены стимулируют выделение гипофизарного пролактина, который также действует на клетки молочной железы [95]. Поскольку в отсутствие гипофиза эстрогены не способны поддерживать рост опухоли молочной железы [96], а пролактин, как уже указывалось, способен в отсутствие яичников и надпочечников поддерживать рост нормальной и опухолевой ткани молочной железы [15, 16], многие рассматривают эстрогены лишь как второстепенный фактор роста и регрессии опухолей. Однако стимуляция пролактином роста опухоли в отсутствие стероидов яичников носит быстропреходящий характер. Если у крыс с ин-

дуцированными ДМБА опухолями одновременно удалить яичники и произвести для повышения выделения пролактина повреждения в срединном возвышении, то ускоренный темп роста опухоли наблюдается лишь до 10—12-го дня, после чего, несмотря на повышенное содержание пролактина, происходит регрессия [29, 33]. Более того, приживаемость трансплантируемой опухоли молочной железы крыс MTW9 зависит, по-видимому, от гормонов яичников [97]. Рост этих опухолей нарушается при иммунизации животных эстрадиолом, присоединенным к бычьему сывороточному альбумину [98]. Суммируя сказанное, можно так определить значение физиологических концентраций эстрогенов: эстрогены являются существенным, но не достаточным фактором роста определенных опухолей молочной железы.

С другой стороны, фармакологические дозы эстрогенов вызывают регрессию опухолей молочной железы [99]. Этот парадоксальный эффект эстрогенов может быть связан с подавлением стимулирующего действия пролактина, поскольку данный эффект исчезает при повышении содержания пролактина за счет стимуляции секреции эндогенного гормона [100] или введения экзогенного пролактина [101].

К настоящему времени получены важные сведения, касающиеся внутриклеточного механизма, обеспечивающего действие эстрогенов и на опухоли молочной железы крыс, и на рак молочной железы человека. Теперь мы перейдем к рассмотрению отдельных сторон этого механизма и их роли в эндокринном контроле раковых клеток молочной железы.

## А. Локализация эстрогенов в чувствительных опухолях

В 1959 г. исследователи двух лабораторий сообщили, что при введении подопытным животным эстрогенов, содержащих радиоактивную метку, эти гормоны накапливаются в тех органах, которые либо чувствительны к эстрогенам, либо экскретируют их [102, 103]. Вскоре после этого были проведены эксперименты с введением тритированного гексэстрола больным раком молочной железы непосредственно перед хирургическим удалением надпочечников как источника эстрогенов в организме. Было обнаружено, что метастазы опухоли у больных, чувствительных к адреналэктомии, накапливали больше $^3$H-гексэстрола, чем метастазы у нечувствительных к операции больных [104]. Иными словами, только чувствительные опухоли вели себя как ткани-мишени для эстрогенов. Другие исследователи, изучавшие поглощение радиоактивных эстрогенов опухолевой тканью молочных желез человека [105—108], обнаружили существование корреляции между захватом эстрогенов злокачественной тканью молочной железы и чувствительностью к эндокринной терапии. Эта корреляция, однако, не была настолько строгой, чтобы ее можно было ис-

пользовать для предсказания чувствительности отдельных больных.

Сходные результаты были получены на экспериментальных карциномах молочной железы; in vitro гормонозависимые опухоли захватывали больше эстрогенов, чем автономные опухоли [109—116]. Это поглощение гормона in vitro можно было полностью подавить синтетическими аналогами эстрогенов, тогда как относительно низкий уровень захвата гормона другими тканями, такими, как мышечная, не подавлялся, что указывает на специфичность захвата эстрогенов опухолями. Основываясь на этих данных, Дженсен предположил, что для предсказания чувствительности к адреналэктомии можно было бы использовать метод определения захвата гормонов образцами опухолевой ткани in vitro. К настоящему времени в тканях-мишенях, включая и опухоли, обнаружены рецепторы эстрогенов [117—119], которые, очевидно, и определяли выявленный ранее специфический захват эстрогенов этими тканями. Последовавшие работы по прямому выявлению рецепторов в опухолях молочной железы и изучению их роли поставили вопрос о возможности использования результатов по определению содержания рецепторов для предсказания гормонозависимости. В следующих разделах будут представлены наши собственные данные, касающиеся этой проблемы.

## Б. Гормонозависимые опухоли молочной железы крыс

Сначала мы доказали наличие эстрогенных рецепторов в цитоплазме гормонозависимых опухолей путем инкубации цитозольной фракции с тритированным эстрадиолом ($^3$Н-Э) и нанесением инкубационной смеси на колонки с сефадексом G-100. Бóльшая часть $^3$Н-Э, обнаруживаемого в элюате, была связана с компонентами фракции макромолекул. При центрифугировании в градиенте концентрации сахарозы обычно выявлялось два максимума связанной с белком радиоактивности с коэффициентами седиментации 8S и 4S. В то время как 8S-пик связывания всегда представляет собой специфические рецепторы эстрогенов, связывание с пиком 4S может быть обусловлено одновременно и специфическими, и неспецифическими связывающими компонентами. В присутствии 0,3 М KCl специфически связанный $^3$Н-Э и в цитозоле матки, и в цитозоле опухоли седиментирует только как 4S-компонент. Это свидетельствует о том, что 8S-рецепторы эстрогенов при высокой ионной силе среды диссоциируют на субъединицы. При физиологической концентрации соли (0,15 М) рецепторы седиментируют со скоростью 6S. 8S-компоненты, полученные в градиентах с низкой ионной силой, являются, вероятно, нефизиологическими формами. Однако их наличие дает единственную возможность выделить специфические рецепторы, поскольку все белки, которые неспецифически связывают эстрадиол, имеют константу

седиментаци 4,6S и ниже. Значение выявленных седиментационных форм рецепторов остается неясным, поскольку такие полианионы, как гепарин, могут в зависимости от их концентрации сообщить рецепторам способность седиментировать с любой скоростью в диапазоне 4—8S [120].

При определении связывающего сродства рецепторов к эстрогенам необходимо отделить связанный гормон от свободного. Для этой цели была использована модификация [121] метода адсорбции на угле, покрытом декстраном, сочетающая в себе удобство и точность. В гормонозависимых индуцированных ДМБА опухолях мы обнаружили наличие лишь одного класса мест связывания эстрогенов с высоким сродством. Константа диссоциации ($K_d$) равна приблизительно $2 \cdot 10^{-10}$ М. Связывание $^3$H-Э специфично для эстрогенов, поскольку оно подавлялось низкими концентрациями немеченых эстрогенов, а гидрокортизон, прогестерон или тестостерон даже в очень большом избытке (1000—10 000-кратном) не влияли на связывание [122].

Таким образом ясно, что гормонозависимые опухоли молочной железы крыс содержат цитоплазматические рецепторы эстрогенов и что свойства этих рецепторов очень близки к свойствам рецепторов других тканей-мишеней. Подобно другим мишеням, гормонозависимые опухоли накапливают введенный эстроген в клеточных ядрах. При этом локализованный в ядрах гормон, очевидно, все еще находится в комплексе с 4—5S-формой рецепторов. Позднее мы рассмотрим ядерное связывание эстрогенов более детально.

### В. Автономные опухоли молочных желез крыс

В качестве модели опухолей, не подвергающихся регрессии после овариэктомии, в нашей лаборатории использовалась перевиваемая карцинома молочной железы крыс R3230AC, подробно описанная Хилфом и др. [86].

Первоначально мы обнаружили, что ядра клеток этой опухоли не концентрируют в сколько-нибудь значительной степени введенный in vivo $^3$H-эстрадиол [123]. Впоследствии этот факт нашел свое объяснение в очень низком содержании цитоплазматических рецепторов: оказалось, что связывающая емкость цитозоля опухоли R3230AC для эстрогенов в 10 раз ниже связывающей емкости цитозоля индуцированной ДМБА опухоли — типичной гормонозависимой опухоли [87]. Константы сродства в обоих случаях были одинаковыми.

Кроме того, мы учли возможность того, что в опухоли R3230AC могла исчезнуть способность рецепторов связываться с хроматином, что также служило бы причиной автономии. Для этого мы готовили хроматин из очищенных ядер опухоли R3230AC и измеряли способность цитозолей с различным содержанием ре-

цепторов стимулировать связывание эстрогена с хроматином. Было обнаружено, что цитоплазматические фракции опухоли R3230AC, мышцы и мозга не обладают способностью стимулировать связывание эстрогена хроматином опухоли. Это обусловлено очень низким содержанием или полным отсутствием рецепторов в данных тканях. В то же время цитозоль матки крыс, весьма богатый рецепторами эстрогенов, обладал способностью стимулировать связывание хроматином опухоли R3230AC значительного количества эстрогена. Полученные данные показывают, что хроматин клеток этой автономной опухоли молочной железы обладает способностью активно взаимодействовать с рецепторами эстрогенов, и, следовательно, отсутствие накопления эстрогенов в ядрах опухоли R3230AC in vivo, очевидно, связано с недостатком рецепторов в цитоплазме [89, 124].

## Г. Акцепторная активность ядер

Концепция специфических ядерных акцепторных мест связывания была предложена для объяснения, с одной стороны, связывания активированных гормоном рецепторов ядерным хроматином, а с другой стороны, последующей инициации синтеза информационной РНК на отдельных участках генома. Было выдвинуто предположение, что такие акцепторы, подобно цитоплазматическим рецепторам, имеются только в клетках-мишенях. Ясно, что если такие акцепторные места связывания действительно существуют как функциональная часть системы ответа на эстрогенный сигнал, то дефектные акцепторы могли бы явиться причиной отсутствия гормональной зависимости у некоторых опухолей.

Полученные нами первоначально данные о том, что хроматин автономной опухоли R3230AC способен акцептировать рецепторы эстрогенов, послужили толчком к изучению способности изолированных ядер самых разных органов взаимодействовать с рецепторами. Было обнаружено, что ядра, полученные из клеток органов-мишеней и немишеней, одинаково хорошо связывают рецепторы эстрогенов [125]. Кроме того, признаков насыщения какого-то специального класса ядерных акцепторных мест связывания получено не было [126]. Эксперименты in vivo привели к сходным выводам [127].

Для объяснения действия рецепторов эстрогенов в клетках-мишенях и в клеточных ядрах опухолей следует, по всей видимости, искать какой-то механизм, отличный от связывания рецепторов небольшим количеством специфических акцепторных мест связывания. Возможно, для проявления эффектов эстрогенов решающее значение имеют какие-то иные типы взаимодействий рецепторов в ядре или даже в цитоплазме, не выявляемые современными методами. Выявлению этих валентностей рецепторов эстрогенов могло бы способствовать изучение нарушений, приводящих к гормональной автономии опухолей.

## Д. Рецепторы эстрогенов в опухолях молочной железы человека

К настоящему времени установлено, что свойства рецепторов эстрогенов опухолей молочной железы человека близки к свойствам рецепторов в индуцированных гормонозависимых опухолях крыс [128]. Два таких свойства были использованы в нашей лаборатории для количественного определения эстрогенных рецепторов в образцах рака молочной железы человека, полученных при хирургическом вмешательстве [121, 129]. Первое из них — это способность связывать $^3$H-Э с высоким сродством. Связывание стероида может быть измерено после отделения несвязанного гормона углем, покрытым декстраном. Скэтчардовский анализ результатов связывания позволяет выявлять рецепторы (если они есть) как компоненты с очень высоким связывающим сродством $K_d = 1 \cdot 10^{-10}$ М). Данный метод позволяет также измерять количество связывающих мест. Второе свойство — это седиментация рецепторов главным образом со скоростью 8S при центрифугировании в градиенте концентрации сахарозы при низкой концентрации соли, что может служить независимым способом для подтверждения наличия рецепторов. Поскольку 4S-пик связывания также может быть частично обусловлен специфическими рецепторами, то для измерения уровня неспецифического связывания применяется параллельное центрифугирование проб, содержащих 100-кратный избыток немеченого эстрадиола.

Теперь мы в состоянии оценить предположение, впервые выдвинутое Дженсеном, что присутствие рецепторов эстрогенов в опухоли молочной железы человека может служить индикатором ее гормонозависимости и способности регрессировать в ответ на соответствующее эндокринное лечение. Для изучения корреляции с чувствительностью к эндокринной терапии нами было проведено определение содержания рецепторов эстрогенов в 226 первичных опухолях и метастазах [130]; к настоящему времени мы исследовали еще 300 опухолей.

Мы обнаружили, что в первичных опухолях содержание эстрогенных рецепторов колеблется от 0 до 1000 фмоль на 1 мг белка цитозоля. Наличие рецепторов было установлено в 70% первичных опухолей и 58% метастазов. Широкий диапазон полученных величин обусловлен, возможно, совокупностью ряда факторов. Во-первых, поскольку опухоли содержат клетки многих типов, то содержание эстрогенных рецепторов может изменяться пропорционально количеству эпителиальных клеток в исследуемом образце. Во многих работах, однако, не обнаружено четкой зависимости между гистологическим строением опухоли и способностью последней связывать эстрадиол [131—134]. Во-вторых, можно было бы предположить, что различия в получаемых величинах содержания рецепторов обусловлены загрязнением образцов опухолей нормальными клетками молочной железы, содержащими рецепторы. Одна-

ко это не так, поскольку в клетках нелактирующей молочной железы человека рецепторы эстрогенов выявляются с трудом [131, 135, 136]. Это подтверждается и результатами исследований на животных, у которых и поглощение эстрадиола, и истинное содержание рецепторов эстрогенов низки в нормальной ткани молочной железы, но значительно увеличиваются в период лактации [137—140]. Наконец, следует учитывать количество эстрадиола, секретируемого у данного больного, поскольку эндогенный эстроген может «занять» рецепторные места связывания, делая их недоступными для определения обычно применяемыми методами. Эта последняя возможность может, по крайней мере частично, объяснить, почему наиболее высокие величины содержания рецепторов эстрогенов обнаруживаются у больных в менопаузе. К настоящему времени для измерения эстрогенных рецепторов, связывающие места которых заняты эндогенным гормоном, разработан так называемый метод обмена.

## Е. Сопоставление с клиническими наблюдениями

Эстрогенные рецепторы опухолей молочной железы исследовались с помощью разнообразных методов и в ряде других лабораторий. Во многих случаях были получены сведения и о содержании рецепторов в опухолях, и о чувствительности тех же опухолей к эндокринной терапии. Сопоставлению этих данных было посвящено международное рабочее совещание, состоявшееся 18—19 июля 1974 г. в Бетесде, штат Мэриленд. На совещании были подробно рассмотрены методы определения рецепторов эстрогенов и критерии клинической оценки развития заболевания. В конечном счете было отобрано 436 испытаний, проведенных на 380 больных. Результаты анализа отобранных случаев суммированы ниже. Для более подробного их изучения читатель может обратиться к специальным статьям, опубликованным в трудах этой конференции [145].

*1. Хирургическое вмешательство (кастрация, адреналэктомия, гипофизэктомия)*. В 33% случаев из 211 проведенных испытаний оперативное воздействие приводило к объективной регрессии опухолей. Хирургическое вмешательство у пациентов с отрицательной пробой на рецепторы эстрогенов лишь в 8 случаях из 94 (8%) дало положительные результаты. В то же время из 107 операций, проведенных на больных с положительной пробой на эстрогенные рецепторы, 59 (55%) сопровождались улучшением.

*2. Аддитивная терапия (фармакологические дозы эстрогенов, андрогенов и глюкокортикоидов)*. Из проведенных 170 испытаний в 34% случаев происходила объективная регрессия опухолей. При лечении больных с отрицательной пробой на рецепторы эстрогенов улучшение наблюдалось после 7 (8%) из 82 курсов аддитивной

терапии. С другой стороны, такое лечение больных с положительной пробой на эстрогенные рецепторы было успешным в 51 (60%) из 85 случаев.

*3. Смешанная терапия.* Из 55 проведенных испытаний в 27% случаев комбинированное эндокринное лечение, включающее антиэстрогены, аминоглутетимид и т. д., оказалось эффективным. Из 32 курсов такого лечения больных с отрицательной пробой на эстрогенные рецепторы положительные результаты наблюдались в 5 (16%) случаях, тогда как у больных с положительной пробой на рецепторы эстрогенов к улучшению привели 10 (43%) из 23 курсов лечения.

Почти не вызывает сомнений, что, исходя из данных о содержании рецепторов эстрогенов, можно будет предсказывать результаты эндокринной терапии метастаза рака молочной железы. Ясно, что если проба на рецепторы эстрогенов в опухоли больного отрицательна, то шансы регрессии опухоли в ответ на эндокринное лечение минимальны. Таким образом, постоянное проведение анализов на наличие рецепторов может избавить значительное количество пациентов от бесполезного хирургического вмешательства по поводу эндокринного лечения. Если же проба на рецепторы эстрогенов в опухоли положительна, то в 55—60% таких случаев эндокринная терапия оказывается эффективной. Эти рассуждения в совокупности с имеющимися клиническими прогностическими факторами, такими, как наличие менопаузы, длительность периода без заболеваний, локализация главного очага, и особенно чувствительность к предыдущей эндокринной терапии, помогут онкологу-практику достаточно обоснованно прибегнуть к эндокринной терапии или отказаться от нее.

Почему же не все больные, опухоли которых дают положительную пробу на эстрогенные рецепторы, чувствительны к эндокринной терапии? Рецепторы эстрогенов представляют собой лишь часть сложной системы гормонального контроля, влияющей на рост и функционирование клеток молочных желез. Также важное значение должен иметь и механизм, с помощью которого пролактин узнает опухоль молочной железы как мишень. В процессах регуляции несомненно участвуют также и другие гормоны. Тем не менее имеющиеся сведения о рецепторах эстрогенов дают основание думать, что потеря эндокринного контроля тесно связана с потерей эстрогенных рецепторов. Означает ли это, что рецепторы других гормонов исчезают вместе с рецепторами эстрогенов и тоже должны отсутствовать в клетках автономных опухолей молочной железы? Или же эстрогенные рецепторы занимают совершенно особое место в формировании гормональной зависимости? Пока мы не ответим на эти вопросы, удобно просто считать, что отсутствие эстрогенных рецепторов в опухолевых клетках является одним из показателей происходящего при злокачественном перерож-

дении отклонения от нормы. Этот показатель может свидетельствовать о потере гормональной зависимости. Можно предсказать, что у больных, эндокринная терапия которых безрезультатна, несмотря на положительную пробу на эстрогенные рецепторы, должны иметься другие биохимические нарушения.

Делающиеся в настоящее время попытки выяснить роль эстроген-рецепторных комплексов в ядре, а также работы по изучению эффектов пролактина и прогестерона непосредственно направлены на решение этой проблемы.

### Ж. Антиэстрогены

После длительного использования в лабораторных исследованиях по гормональной зависимости антиэстрогены недавно нашли применение при экспериментальной терапии рака молочной железы человека. Существует несколько типов антиэстрогенов, различающихся по месту их вмешательства в процесс развития эстрогенного эффекта. Соединения, представляющие интерес с точки зрения обсуждаемого вопроса, действуют путем прямой конкуренции с активными эстрогенами за связывающие места рецепторов. Эти вещества широко использовались для дифференцированного измерения специфического и неспецифического связывания при определении рецепторов по поглощению гормона срезами ткани; специфически связанной считается та доля связанного гормона, которая исчезает под действием избытка конкурирующего антиэстрогена [115]. Например, Терениус [146] для выявления специфического связывания эстрогенов использовал способность кломифена и соединения U-11,100 A подавлять поглощение эстрадиола срезами опухолей молочной железы человека и крыс.

Антиэстрогены способны вызвать регрессию индуцированных ДМБА опухолей молочной железы крыс [146—149], хотя в одной работе сообщалось о способности этих агентов стимулировать рост опухоли [150]. Терапия антиэстрогенами больных с метастазом рака молочной железы позволяет достичь той же скорости ремиссии, что и при использовании обычных схем эндокринного лечения [151—155]. Можно было бы ожидать, что случаи ремиссии должны строго соответствовать наличию рецепторов эстрогенов в образцах опухоли, полученных при биопсии. Однако по данным, отобранным упоминавшимся выше рабочим совещанием [145], корреляция между результатами лечения антиэстрогенами и присутствием эстрогенных рецепторов не столь явная, как при других типах эндокринной терапии. Пока удовлетворительного объяснения этому факту нет. Однако исследователи, занимающиеся механизмом действия антиэстрогенов, смогут, вероятно, подойти к решению данного вопроса уже в ближайшем будущем [156, 157].

Существует предположение, что действие антиэстрогенов на ткань опухоли молочной железы играет и другую роль. Известно,

что эстриол (стероид, обладающий слабой утеротропной активностью) действует как антиэстроген, конкурируя с эстрадиолом за связывающие места цитоплазматических рецепторов тканей молочной железы. На этом основании было выдвинуто допущение, что эстриол может проявлять свойства сильного антиканцерогена [158—161]. Высказано также предположение о том, что наблюдаемое при беременности повышение экскреции эстриола играет определенную роль в защитном действии начала беременности против развития рака молочной железы [162, 163]. Однако маловероятно, чтобы это имело место в действительности: эстриол по сравнению с эстрадиолом связывается довольно слабо, и для эффективной конкуренции потребовалось бы значительное количество эстриола [164]. На самом же деле, как это было недавно показано, при беременности содержание неконъюгированного эстрадиола выше, чем эстриола [165, 166]. Кроме того, эстриол сам по себе способен входить в ядра клеток-мишеней и индуцировать синтез белка, специфичного для действия эстрогенов на матку крыс. Степень этой стимуляции пропорциональна количеству эстриола, связанного цитоплазматическими рецепторами, и количеству эстриола, обнаруживаемого в ядре [167]. Однако, несмотря на недостаточную теоретическую обоснованность определенных тезисов эстриоловой гипотезы, не следует игнорировать очень важные факты, касающиеся защитного действия ранней беременности на последующее развитие рака молочной железы. За немногими исключениями [168], новых путей решения этой проблемы, к сожалению, не предлагается.

## 3. Системные подходы к снижению образования эстрогенов

У овариэктомированных больных в пременопаузе или у больных в постменопаузе надпочечники секретируют предшественники эстрогенов, которые в периферических тканях превращаются в эстрогены [169—173]. Это послужило логической основой для хирургической адреналэктомии таких больных. Вместо хирургического удаления надпочечников было использовано также введение фармакологических доз глюкокортикоидов, приводившее к ингибированию выделения АКТГ и к атрофии надпочечников. Подобный фармакологический подход обеспечивает полную ремиссию в 25% случаев [174], что несколько ниже, чем при использовании хирургической адреналэктомии [2]. Этот факт, а также то, что высокие дозы глюкокортикоидов оказывают ряд побочных эффектов, лег в основу нового подхода к проблеме подавления функций надпочечников. Антиконвульсивный препарат аминоглутетимид блокирует стероидогенез на ранней стадии биосинтеза [175, 176]. Снижение образования кортизола приводит, однако, к значительному компенсаторному повышению секреции АКТГ. Это вызывает в свою очередь гипертрофию надпочечников, что препятствует торможе-

нию стероидогенеза, происходящему под действием лекарственного препарата. Вполне логичные попытки использовать физиологические количества дексаметазона для подавления индуцируемого аминоглютетимидом повышения содержания АКТГ не принесли желаемых результатов [177, 178]. Оказалось, что аминоглютетимид ускоряет метаболизм дексаметазона [179]. С помощью более высоких доз дексаметазона [179] удалось добиться полного подавления функций надпочечников в течение 19 мес. Объективная регрессия опухолей наблюдалась у 8 из 22 больных; кушингоидных побочных эффектов при этом не было.

Таким образом, совместное использование аминоглютетимида и дексаметазона для лечения рака молочной железы больных в постменопаузе, по-видимому, позволяет добиться эффективной адреналэктомии без хирургического вмешательства. Вполне возможно (по крайней мере теоретически), что овариэктомию больных, находящихся в пременопаузе, удастся заменить аналогичной схемой лечения, используя либо только антиэстрогены, либо их комбинацию с ингибитором секреции гонадотропинов.

## IV. ПРОГЕСТЕРОН

### А. Клинические данные о влиянии на рак молочной железы

В ранних работах Хаггинса и др. [35, 180, 181] были приведены данные о влиянии прогестерона на развитие экспериментального рака молочной железы. Эти авторы обнаружили, что беременность способствует росту индуцированных ДМБА опухолей молочной железы у крыс. Введение прогестерона интактным крысам ускоряло появление опухолей, увеличивало их количество и повышало скорость роста уже появившихся опухолей. Рассмотренные в предыдущих разделах данные также указывают на стимулирующее действие прогестерона в отношении роста опухолей молочной железы крыс. Овариэктомия этих животных при одновременном повреждении срединного возвышения приводит, несмотря на высокое содержание пролактина, к регрессии опухолей [26, 33]. Развитие опухоли у лактирующих, кормящих крыс можно предотвратить удалением яичников; введение одного лишь прогестерона восстанавливает рост опухолей [36—38]. Эти наблюдения еще не доказывают, что один только прогестерон ответствен за поддержание роста опухоли, поскольку у животных, на которых проводились опыты, оставались интактными надпочечники и было высокое содержание пролактина. Но, с другой стороны, эти данные убедительно показывают, что в стимуляции роста опухоли прогестерон играет важную физиологическую роль.

В отличие от описанного выше стимулирующего действия, наблюдавшегося при введении одного прогестерона, этот гормон в сочетании со средними или высокими дозами эстрогенов может вызывать регрессию опухолей молочной железы или предотвра-

щать их появление [35, 182]. У людей относительное число случаев регрессии опухоли молочной железы при лечении прогестероном в сочетании с эстрогенами обычно выше, чем при лечении одним прогестероном [183]. Значение этих наблюдений несколько сомнительно, поскольку эстрогены в средних и высоких дозах сами по себе могут приводить к регрессии опухолей молочной железы у крыс [99—101] и людей [104]; поэтому необходимо установить, усиливает ли гестаген эффект эстрогенов. Ответ на этот вопрос, по-видимому, будет положительным. Об этом свидетельствуют следующие данные. У некоторых больных введение высоких доз эстрогенов не вызывало регрессии опухолей, сочетание же эстрогенов с прогестероном давало положительные результаты [185—187]. В постменопаузе, когда содержание эндогенных эстрогенов (вероятно, надпочечникового происхождения) достаточно для ороговения влагалищного эпителия, лечение одним прогестероном приводит к ремиссии в 29% случаев. В то же время аналогичное лечение больных с атрофическими влагалищными мазками вызывает ремиссию лишь в 6% случаев [188]. Эти данные свидетельствуют о необходимости эстрогенов для опосредуемой прогестероном регрессии опухолей. Механизм, с помощью которого прогестерон способствует регрессии, остается неясным. Высокие дозы синтетических прогестинов способны значительно снижать содержание ЛГ и кортизола в сыворотке крови, что указывает на возможное участие гипофиза в антиканцерогенном действии прогестерона [189]. Но, с другой стороны, сообщалось, что ремиссия опухоли молочной железы после лечения эстрогенами в сочетании с прогестероном имела место по крайней мере у четырех предварительно гипофизэктомированных больных [190, 191]. Лечение же гипофизэктомированных больных только эстрогенами к улучшению не приводит [44, 45, 192].

### Б. Метаболизм прогестерона в субклеточных фракциях

Прогестерон служит общим предшественником для эстрогенов, андрогенов и кортикостероидов. Многочисленные исследования были посвящены изучению захвата и метаболизма прогестерона в матке [193—208], молочной железе [209, 210] и других органах-мишенях [211—215]. Результаты этих исследований и их интерпретация часто были прямо противоположными, что объясняется следующими причинами. Во-первых, исследования выполнялись на множестве различных тканей разных видов животных, причем использованные условия тоже были неодинаковыми: in vivo, in vitro или в бесклеточных системах. Во-вторых, в одних случаях применялись высокие концентрации прогестерона, в других — низкие. В-третьих, часть работ выполнялась на нормальных животных, а часть — на псевдобеременных или беременных. Пути метаболизма прогестерона у животных, получавших эстрогены,

и у кастрированных животных различаются. Таким образом, можно понять, почему нельзя составить простую общую схему метаболизма прогестерона.

Серьезной проблемой в более ранних исследованиях являлось то обстоятельство, что не удавалось выявить внутриклеточные рецепторы прогестерона и показать их биологическое значение. Хотя, может быть, и не совсем правильно полагать, что все эффекты прогестерона должны опосредоваться рецепторным механизмом, для начала было бы неплохо выяснить, какие метаболиты в данной ткани могут связываться с рецепторами прогестерона и коррелирует ли это связывание с биологической активностью этих метаболитов. Это могло бы дать ответ на вопрос о том, является ли данный метаболический путь существенным для действия прогестерона или же этот путь служит лишь для его разрушения и выведения из организма. Такой подход избрал Стротт [215], изучавший метаболизм прогестерона в яйцеводах цыплят in vitro. Оказалось, что и прогестерон, и его метаболит 5$\alpha$-прегнан-3,20-дион хорошо связываются рецепторами. По способности индуцировать синтез специфического для яйцеводов белка этот метаболит был таким же активным, как и прогестерон. Быстрое появление значительных количеств неидентифицированного полярного метаболита, который не связывается рецепторами, дает основание думать, что в прекращении действия прогестерона может играть важную роль система гидроксилаз.

## В. Рецепторы прогестерона

Обратимся теперь к работам по изучению рецепторов прогестерона и их зависимости от эстрогенной стимуляции. Интенсивные исследования, проведенные на матке морских свинок, со всей убедительностью показали наличие рецепторов прогестерона у млекопитающих [216—229]. При градиентном центрифугировании в растворе сахарозы рецепторы седиментируют со скоростью 6—8 S и не связывают глюкокортикоидов. Максимальное содержание рецепторов прогестерона в матке наблюдается в проэструсе; в течение эструса и метаэструса содержание рецепторов постепенно падает, достигая минимума в диэструсе, когда их концентрация снижается в 16 раз. Введение эстрогенов приводит к 8-кратному увеличению содержания прогестиновых рецепторов за 24 ч; это увеличение можно предотвратить добавлением ингибиторов синтеза белка или РНК. Обычно период полужизни рецепторов прогестерона составляет приблизительно 3—5 дней, но при введении прогестерона исчезновение рецепторов из цитоплазмы матки происходит в течение 3 ч. Прямые биохимические и радиоавтографические исследования указывают на транслокацию цитоплазматических рецепторов в ядро. Сходные заключения были получены в отношении прогестиновых рецепторов у хомячков [230, 231], кро-

ликов [232—237], мышей [238, 239], крыс [232—234, 238—247] и человека [248—255]. У двух последних видов получение воспроизводимых данных о наличии рецепторов прогестерона оказалось нелегким делом. Это обусловлено тем, что бóльшая часть радиоактивного прогестерона связывается в области 4 S градиента плотности сахарозы, что затрудняет различение прогестиновых рецепторов и кортикостероидсвязывающего глобулина.

Хотя цитированные только что работы и не объясняют способности прогестерона вызывать регрессию или стимуляцию рака молочной железы у человека и экспериментальных животных, они помогают понять, почему эстрогены необходимы для действия прогестерона. Самое главное, что эстрогены стимулируют прогестиновые рецепторы. Пока еще не установлено, действуют ли эстрогены прямо на клетки-мишени, индуцируя синтез рецепторов прогестерона, или же они способствуют высвобождению из гипофиза пролактина, который мог бы в свою очередь стимулировать прогестиновые рецепторы. (Даже если дело обстоит и так, это не исключает прямого действия эстрогенов на пролактин через их собственные рецепторы в клетках-мишенях.) Эти гипотетические механизмы, если они подтвердятся, помогут объяснить некоторые обсуждавшиеся выше непонятные моменты в действии пролактина на опухолевый рост.

### Г. Рецепторы прогестерона в раковой опухоли молочной железы человека

Как указывалось выше, метастатический рак молочных желез можно лечить либо путем хирургического вмешательства, либо с помощью гормональной фармакотерапии. К сожалению, при таком лечении ремиссия наблюдается только в 20—40% случаев. Эффективность лечения удается повысить до 55—60% применением эндокринной терапии лишь в тех случаях, когда опухоли содержат рецепторы эстрогенов. Следовательно, необходимо выявлять тех 40% больных с положительной пробой на эстрогенные рецепторы, опухоли которых потеряли свою чувствительность к гормонам. Это позволит избавить их от неоправданной терапии.

Присутствие рецепторов эстрогенов в злокачественных клетках свидетельствует о том, что по крайней мере часть нормальной системы контроля остается в этих клетках интактной. Однако связывание рецепторами — это лишь первая стадия гормонального действия. Поэтому возможно, что при наличии эстрогенных рецепторов отсутствие гормональной чувствительности опухолей объясняется повреждением более отдаленных звеньев в цепи последовательных реакций на гормон. Поэтому идеальным маркером зависимости от гормона был бы поддающийся измерению продукт гормонального действия, а не первоначальное связывание гормона.

В свете данных о зависимости прогестиновых рецепторов от

эстрогенов мы исследовали возможность использования в качестве такого маркера рецепторов прогестерона. Можно было бы ожидать, что в опухолях, лишенных эстрогенных рецепторов, рецепторы прогестерона должны встречаться редко. Присутствие прогестиновых рецепторов в опухолях, содержащих рецепторы эстрогенов, будет указывать, с одной стороны, на интактность по крайней мере части системы реакции на эстрогены, а с другой стороны, на наличие достаточного для активации этой системы количества эстрогенов. Если это так, то рост подобных опухолей должен быть гормонозависимым, а рост опухолей, содержащих рецепторы эстрогенов, но лишенных рецепторов прогестерона, по всей вероятности, должен быть автономным.

Для идентификации прогестиновых рецепторов в раковой ткани молочной железы человека мы выбрали прямое определение связывания синтетического прогестина $^3$H-R5020 [239] в области 8 S-градиента плотности сахарозы [256], а не косвенный метод измерения рецепторов по дифференциальной конкуренции [257]. Нерадиоактивные прогестерон или соединение R5020, присутствующие в избытке, конкурентно тормозят связывание соединения $^3$H-R5020 в области 8S-градиента, тогда как гидрокортизон, дексаметазон или эстрадиол практически не влияют на это связывание. К настоящему времени мы измерили рецепторы прогестинов и эстрогенов более чем в 50 опухолях молочной железы человека. Как и предполагалось, во всех этих опухолях, лишенных рецепторов эстрогенов, нет и рецепторов прогестинов. Среди опухолей, содержавших рецепторы эстрогенов, 56% содержали и прогестиновые рецепторы. Эта цифра приближается к ожидаемому количеству опухолей, которые должны реагировать на эндокринную терапию. Таким образом, полученные данные по крайней мере не противоречат гипотезе о возможности использования рецепторов прогестерона в качестве маркера гормонозависимости [258].

Для подтверждения этой гипотезы необходимо наличие прямой корреляции между наличием прогестиновых рецепторов и объективными клиническими данными о ремиссии опухолей. К настоящему времени полностью обследовано слишком мало больных. Однако если клинические исследования подтвердят наше предположение, наличие рецепторов прогестерона будет свидетельствовать о функционировании по крайней мере части системы, обеспечивающей гормональный контроль, что может быть использовано в качестве более надежного маркера гормонозависимости.

## V. ГЛЮКОКОРТИКОИДЫ

Глюкокортикоиды действуют на многие нормальные ткани. В молочной железе крыс эти стероиды совместно с пролактином поддерживают лактацию [91]; скорость образования молока лимитируется содержанием глюкокортикоидов [259, 260]. Эксперимен-

ты с эксплантантами молочной железы показали, что пролиферация и поддержание целостности грубой эндоплазматической сети при лактации обусловлены прямым действием глюкокортикоидов [261].

Во многих тканях-мишенях были обнаружены специфические рецепторные белки для глюкокортикоидов. Эти белки, как и рецепторы других стероидных гормонов, по-видимому, локализованы в цитоплазме, а после взаимодействия с глюкокортикоидами транслоцируются в клеточное ядро [262]. В печени и в ткани гепатомы гормон-рецепторные комплексы действуют главным образом как индукторы, тогда как в лимфоцитах и в клетках лимфомы они оказывают ингибиторное действие и в конечном счете приводят к гибели клеток [263]. Показано, что большинство резистентных к глюкокортикоидам клеток, полученных из стабильных линий лимфомы и изолированных лейкемических лимфобластов человека, теряет свои цитоплазматические рецепторы [264—266]. Представляет, однако, интерес тот факт, что примерно 10% нечувствительных линий клеток содержат измененные рецепторы, которые не способны проникать в ядро, а другие 10% содержат нефункционирующие рецепторы другого типа [267—269]. Ясно, что на пути от связывания гормона до реакции клетки могут возникать различные поломки.

При лечении рака у людей, особенно при малигнизации лимфатического происхождения, глюкокортикоиды используются весьма широко. Было обнаружено, что эти гормоны подавляют рост самых различных опухолей молочной железы животных, включая опухоль R3230AC [270, 271]. Но, как ни парадоксально, эти же глюкокортикоиды могут способствовать индукции опухолей химическими канцерогенами [272]. Ранее уже обсуждалась эффективность глюкокортикоидов при лечении рака молочной железы человека. Следует отметить сравнительно новые данные о том, что регрессия под влиянием преднизона наблюдалась только тогда, когда опухоль содержала рецепторы эстрогенов [273]. Следовательно, лечение глюкокортикоидами имеет, по-видимому, определенные преимущества по сравнению с хирургическими методами лечения и лечения другими гормонами.

Истинный механизм индуцируемой глюкокортикоидами ремиссии неизвестен. Высказывалось предположение, что обычно используемые высокие дозы этих гормонов блокируют образование АКТГ и тем самым выключают синтез предшественников эстрогенов в надпочечниках [273]. Предполагалось также, что эффект этот распространяется на клеточные, но не на гуморальные иммунные механизмы. Это могло бы приводить к выработке меньшего количества антител, препятствующих опосредуемому клетками разрушению опухоли [274]. Судя по тому, что глюкокортикоидные рецепторы, как это было недавно показано, содержатся в некоторых опухолях молочной железы животных [275, 276] и в нормаль-

ной ткани лактирующих молочных желез [277—279], глюкокортикоиды могут оказывать и непосредственное действие на клетки опухоли молочной железы. И опухоли R3230AC крыс [275], и индуцированные вирусами опухоли мышей [276] содержали значительно меньше рецепторов, чем соответствующие железы в период лактации, но значительно больше, чем железы девственных или беременных животных [279]. В качественном отношении все эти рецепторы близки между собой. О наличии и распределении рецепторов глюкокортикоидов в раковой ткани молочной железы человека пока ничего не известно. Не известно также, имеется ли какая-либо корреляция между наличием рецепторов глюкокортикоидов и индуцируемой этими гормонами ремиссией.

## VI. АНДРОГЕНЫ

Андрогены действуют на клетки-мишени посредством рецепторного механизма, во многом сходного с описанным выше механизмом для других стероидов [262]. Известно, что исходно секретируемым андрогеном является тестостерон. Однако, как показывают многочисленные данные, в ряде тканей-мишеней, включая и предстательную железу, связыванию тестостерона с рецепторами андрогенов и проникновению в клеточное ядро должно предшествовать его превращение под действием 5α-редуктазы ($\Delta^4$-3-кетостероид-5α-редуктазы) в дигидротестостерон. Дигидротестостерон в свою очередь метаболизируется 3-кеторедуктазой (3-кетостероидоксидоредуктазой) до андростандиолов, которые не связываются рецепторами дигидротестостерона. На основании различий в действии дигидротестостерона и андростандиолов in vitro было высказано предположение, что оба типа соединений, действуя с помощью различных механизмов, могут выполнять физиологически важную роль [280]. Специальных же рецепторов для андростандиолов, однако, обнаружено не было. С другой стороны, некоторые ткани могут иметь другие рецепторы, специфичные для самого тестостерона. Так, в почках мышей 5α-редуктазная активность очень низка, поэтому $^3$H-тестостерон транслоцируется в ядра главным образом в неметаболизированном виде и, по-видимому, является активным андрогеном [281]. В цитозоле почек мышей дигидротестостерон быстро превращается в андростандиолы даже при 4° С, поэтому сродство рецепторов этого органа к дигидротестостерону было трудно измерить [281]. In vitro 3-кеторедуктазная реакция обратима, что может обусловливать биологическую активность андростандиолов в почках мышей за счет обратного превращения в дигидротестостерон [282]. Таким образом, остается неясным, существуют ли рецепторы андрогенов, отличные от рецепторов дигидротестостерона.

Значение метаболизма тестостерона по крайней мере для некоторых проявлений андрогенной активности особенно ярко выяв-

ляется при двух врожденных заболеваниях. Описанный у мышей, крыс и человека синдром тестикулярной феминизации обусловлен, по-видимому, недостаточностью рецепторов дигидротестостерона [283—285]; превращение тестостерона в дигидротестостерон 5α-редуктазой в этих случаях, очевидно, происходит нормально [286]. Известна, однако, другая форма наследуемого мужского псевдогермафродитизма у людей, при которой имеется недостаточность 5α-редуктазы при нормальном образовании тестостерона [287]. Однако наблюдения, согласно которым у таких больных в возрасте около 12 лет происходит значительное развитие мужских признаков, а также сведения о чрезвычайно низкой активности 5α-редуктазы в тканях взрослых животных [288] в сочетании с данными о падении в процессе онтогенеза содержания рецепторов дигидротестостерона [289] дают основание думать, что превращение тестостерона в дигидротестостерон после того, как развитие организма уже завершилось, может иметь меньшее значение.

Содержание рецепторов дигидротестостерона в предстательной железе крыс, видимо, быстро падает после кастрации [290]. В одной из работ было обнаружено, что содержание рецепторов дигидротестостерона восстанавливается через несколько дней, даже если животных адреналэктомировать или гипофизэктомировать. Авторы этой работы пришли к выводу, что в контроле содержания рецепторов принимает участие некий фактор, отличный от стероидных и гипофизарных гормонов [291]. В другой работе такого восстановления содержания рецепторов не наблюдалось [292], но было обнаружено, что через 7 дней после кастрации способность предстательной железы накапливать дигидротестостерон в клеточных ядрах изменилась незначительно, несмотря даже на то, что цитоплазматические рецепторы дигидротестостерона уже не могли быть выявлены. Было обнаружено, что в цитозоле предстательной железы после кастрации появляется компонент, препятствующий связыванию дигидротестостерона с рецепторами. Это дает основание думать, что наблюдаемое после кастрации исчезновение рецепторов может быть мнимым (по крайней мере частично), а не истинным. Показано также, что 5α-редуктаза стимулируется тестостерон-пропионатом [293] и тормозится эстрадиолом [294]. Аналогичных данных о контроле содержания рецепторов дигидротестостерона или активности 5α-редуктазы в других тканях не имеется; физиологическое значение такой регуляции не установлено.

Были описаны аналоги андрогенов, действующие как антиандрогены. Их можно разделить на два класса: соединения, относящиеся к первому классу, обладают гестагенной активностью, например ципротеронацетат и медроксипрогестеронацетат. Соединения второго класса такой активностью не обладают (флутамид, БОМТ, неэтерифицированный ципротерон). Соединения обоих классов непосредственно ингибируют связывание дигидротестостерона с

рецепторами [295, 296]. Гестагенные антиандрогены связываются также рецепторами прогестерона [297]. Это, вероятно, и является причиной кажущегося синергизма в действии андрогенов и гестагенных антиандрогенов на некоторые ткани, когда антигормоны применяются в дозах, более низких, чем это необходимо для проявления их антиандрогенного действия [298].

Во многих случаях андрогены вызывают регрессию индуцированных канцерогенами опухолей молочной железы крыс [4, 299]. Этот эффект меняется на противоположный при очень высоких дозах андрогенов [300]. Ряд андрогенов и их производных оказались эффективными при лечении рака молочной железы человека [301—303]. Как и другие виды эндокринного лечения, андрогенная терапия дает положительные результаты, по-видимому, только в случае тех опухолей, в которых имеются рецепторы эстрогенов [145]. Истинный механизм индуцируемой андрогенами регрессии не известен. Имеющиеся в настоящее время данные позволяют высказать на этот счет по крайней мере пять различных гипотез.

1. Возможно, что андрогены действуют непосредственно на опухоли через андрогенные рецепторы. Сейчас нет данных о том, что рецепторы андрогенов необходимы для нормальной половой функции самок. Более того, недостаточность андрогенных рецепторов у мышей с тестикулярной феминизацией Tfm/0 не сказывается существенно на их репродуктивной функции (за исключением несколько более раннего старения яичников) [304, 305]. Но, с другой стороны, андрогены вызывают регрессию зачатков молочных желез или эксплантатов таких зачатков от плодов обоего пола [306]. Этот эффект андрогенов предотвращается ципротеронацетатом [307, 308], что согласуется с предположением об участии рецепторов дигидротестостерона в действии андрогенов. В опухолях молочной железы человека обнаружены и рецепторы дигидротестостерона [309], и ферменты метаболизма андрогенов, включая 5$\alpha$-редуктазу [310—312]. Следовательно, возможно, что рецепторная система для дигидротестостерона принимает участие и в регрессии опухолей. Было показано, что андрогенозависимая трансплантируемая опухоль молочной железы крыс Shionogi 115 содержит рецепторы дигидротестостерона и способна превращать тестостерон в дигидротестостерон [313]. В линиях тканевой культуры этой опухоли для стимуляции роста необходимо превращение тестостерона в дигидротестостерон [314]. В близкой к этой, но уже автономной опухоли концентрация рецепторов дигидротестостерона в четыре раза ниже; в четыре раза ниже в данной опухоли и способность накапливать дигидротестостерон в ядрах [313]. Это свидетельствует о том, что при отсутствии гормональной зависимости рецепторная система для андрогенов, возможно, уже не нужна.

2. В лаборатории Мейтса недавно было обнаружено, что высокие дозы пролактина способны противодействовать вызываемому тестостероном подавлению роста индуцированных ДМБА опухолей [315]. Поскольку введение тестостерона не приводит к понижению содержания пролактина в крови [316], было высказано предположение, что андроген способен каким-то образом снижать чувствительность опухоли к пролактину, действуя, возможно, на рецепторы пролактина.

3. Вполне возможно, что способность андрогенов вызывать регрессию опухолей обусловлена их превращением в эстрогены. Эстрогены, введенные в фармакологических дозах, действительно предотвращают опухолевый рост, поэтому превращение хотя бы 2% из 1 мг тестостеронпропионата (дозы, обычно вводимой крысам) могло бы дать количество экстрадиола, достаточное для индукции регрессии [101]. Известно также, что регрессию, вызванную и андрогенами, и эстрогенами, можно предотвратить высокими дозами пролактина [101, 315]. Эти данные указывают на параллелизм в механизмах действия эстрогенов и андрогенов.

4. Возможна и обратная ситуация: андрогены могут блокировать образование эстрогенов. Хотя в принципе и не исключено, что андрогены подавляют секрецию гонадотропинов, угнетая тем самым функцию яичников, вряд ли этот механизм имеет большое значение у женщин в постменопаузе. Более вероятно, что андрогены ингибируют превращение предшественников надпочечникового происхождения в активные эстрогены на периферии. Такой механизм соответствовал бы данным об активности некоторых андрогенов, которые, по-видимому, не могут превращаться в эстрогены. По крайней мере для одного из них — $\Delta^1$-тестололактона — гормональная активность вообще не обнаружена [303]. Исходя из наличия такого механизма, можно понять, почему при очень высоких дозах тестостеронпропионат более эффективно стимулирует регрессию индуцированных ДМБА опухолей, чем при более низких дозах [300]. Возможно, промежуточные дозы действуют в качестве ингибиторов превращения надпочечниковых предшественников, а очень высокие дозы создают возможность превращения в эстрогены очень небольшой части самого вводимого тестостерона, что приводит к образованию эстрогенов в количестве, достаточном для стимуляции опухолевого роста.

5. Поскольку опухоли, лишенные рецепторов эстрогенов, не способны реагировать на введение андрогенов [145], было высказано предположение, что андрогены могут влиять непосредственно на рецепторы эстрогенов. Известно, что андрогены не конкурируют с эстрадиолом за связывающие участки

рецепторов эстрогенов [317], но они, по имеющимся данным, могут вызывать транслокацию несвязанных со стероидом рецепторов эстрогенов в клеточное ядро [318]. В результате необходимые для действия эстрогенов рецепторы оказываются, вероятно, недоступными для гормонов. Механизм данного явления неизвестен. Эти результаты не противоречат предположению о том, что некий метаболит дигидротестостерона хотя и слабо, но все же связывается рецепторами эстрогенов; рецепторы в результате перемещаются в ядро, а лиганд теряется в процессе экспериментальных процедур. Следует заметить, что данный феномен не обнаружен пока в условиях in vivo.

Легко представить себе, что действие андрогенов на нормальные ткани-мишени и на опухоли может быть опосредовано различными механизмами. Если это действительно так, то раскрытие истинных механизмов могло бы привести к созданию аналогов андрогенов, более эффективных при клиническом использовании и не обладающих вирилизирующим действием. С другой стороны, это расширило бы наши представления об эндокринном контроле роста опухолей молочных желез.

Данная работа частично финансировалась из фондов VSPHS CA-11378, CB-23862 и фонда BC-23D Американского онкологического общества.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. *Beatsoh C. T., Lancet, ii, 104*, 162 (1896).
2. *Dao T. L.*, Ann. Rev. Med., *23*, 1 (1972).
3. *McGuire W. L., Chamness G. C., Costlow M. E., Shepherd R. E.*, Metabolism, *23*, 75 (1974).
4. *Huggins C., Grand L. D., Brillantes F. P.*, Nature, *189*, 204 (1961).
5. *Dao T. L.*, Prog. Exp. Tumor Res., *5*, 157 (1964).
6. *Archer F. L., Orlando R. A.*, Cancer Res., *28*, 217 (1968).
7. *Hilf R., Battaglini J. W., Delmez J. A., Cohen N., Rector W. D.*, Cancer Res., *31*, 1195 (1971).
8. *Simpson-Herren L., Griswold D. P.*, Cancer Res., *30*, 813 (1970).
9. *Griswold D. P., Green C. H.*, Cancer Res., *30*, 819 (1970).
10. *Kim U., Furth J., Yannopoulos K.*, J. Natl. Cancer Inst., *31*, 233 (1963).
11. *MacLeod R. M., Allen M. S., Hollander V. P.*, Endocrinology, *75*, 249 (1964).
12. *Gullino P. M., Grantham F. H., Losonczy I., Berghoffer B.*, J. Natl Cancer Inst., *49*, 1333 (1972).
13. *Meites J.*, J. Natl. Cancer Inst., *48*, 1217 (1972).
14. *Pearson O. H., Murray R. M. L., Mozaffarian G., Pensky J.*, in: Prolactin and Carcinogenesis (A. R. Boyns and K. Griffithtls, eds.), Alpha Omega Alpha, Cardiff, Wales, 1972, p. 154.
15. *Pearson O. H., Llerena O., Llerena L., Molina A., Butler T. P.*, Trans. Assoc. Am. Physicians, *82*, 225 (1969).
16. *Nagasawa H., Yanai R.*, Int. J. Cancer, *6*, 488 (1970).
17. *Butler T. P., Pearson O. H.*, Cancer Res., *31*, 817 (1971).
18. *Pierpaoli W., Sorkin E.*, Nature [New Biol.], *238*, 58 (1972).
19. *Lu K.-H., Koch Y., Meites J.*, Endocrinology, *89*, 229 (1971).

20. *Wuttke W., Cassell E. E., Meites J.*, Endocrinology, *88*, 737 (1971).
21. *Heuson J. C., Waelbroeck C., Legros N.*, Eur. J. Cancer, *6*, 353 (1970).
22. *Cassell E. E., Meites J., Welsch C. W.*, Cancer Res., *31*, 1051 (1971).
23. *Stähelin H., Burchhardt-Vischer B., Fluckiger E.*, Experientia, *27*, 915 (1971).
24. *Quadri S. K., Meites J.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., *138*, 999 (1971).
25. *Clemens J. A., Shaar C. J.*, Proc. Exp. Biol. Med., *139*, 659 (1972).
26. *Welsch C. W., Turri G. I., Meites J.*, Int. J. Cancer, *12*, 206 (1973).
27. *Floss H. G., Cassidy J. M., Robbers J. E.*, J. Pharm. Sci., *62*, 669 (1973).
(A. V.
28. *Meites J., Nicoll C. S., Talwalker P. K.*, in: Advances in Neuroendocrinology (A. V. Nalbandov, ed.), Univ. of Illinois Press, Urbana, 1963, p. 238.
29. *Clemens J. A., Welsch C. W., Meites J.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., *127*, 969 (1968).
30. *Klaiber M. S., Gruenstein M., Meranze D. R., Shimkin M. B.*, Cancer Res., *29*, 999 (1969).
31. *Nagasawa H., Meites J.*, Cancer Res., *30*, 1327 (1970).
32. *Meites J., Lu K.-H., Wuttke W., Welsch C. W., Nagasawa N., Quadri S. K.*, Recent Prog. Horm. Res., *28*, 471 (1972).
33. *Sinha D., Cooper D., Dao T. L.*, Cancer Res., *33*, 411 (1973).
34. *Dao T. L., Sunderland H.*, J. Natl. Cancer Inst., *23*, 567 (1959).
35. *Huggins C, Moon R. C., Morii S.*, Proc. Natl. Acad. Sci., *48*, 379 (1962).
36. *McCormick G. M., Moon R. C.*, Br. J. Cancer, *19*, 160 (1965).
37. *McCormick G. M., Moon R. C.*, Cancer Res., *27*, 626 (1967).
38. *McCormick G. M.*, Cancer Res., *32*, 1574 (1972).
39. *Frantz A. G., Kleinberg D. L., Noel G. L.*, Recent Prog. Horm. Res., *28*, 527 (1972).
40. *Sherwood L. M.*, N. Engl. J. Med., *284*, 774 (1971).
41. *Luft R., Olivecrona H., Sjogren B.*, Nord. Med., *47*, 351 (1952).
42. *Pearson O. H., West C. D.. Hollander V. P., Treves N. E.*, JAMA, *154*, 234 (1954).
43. *Pearson O. H., Ray B. S., Harrold C. C., West C. D., Li M. C., MacLean J. P., Lipsett M. B.*, Trans. Assoc. Am. Physicians, *68*, 101 (1955).
44. *Pearson O. H., Ray B. S.*, Cancer Res., *20*, 1172 (1960).
45. *Lipsett M. B., Bergenstal D. M.*, Cancer Res., *20*, 1172 (1960).
46. *Malarkey W. B., Jacobs L. S., Daughady W. H.*, N. Engl. J. Med., *285*, 1160 (1971).
47. *Kleinberg D. L., Noel G. L., Frantz A. G.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *33*, 873 (1971).
48. *Friesen H. G., Guyda H., Hwang P., Tyson J. E., Barbeau A.*, J. Clin. Invest., *51*, 706 (1972).
49. *Dickey R. P., Minton J. P.*, Am. J. Obstet. Gynecol., *114*, 267 (1972).
50. *Stoll B. A., Lancet*, i. 431 (1972).
51. *Murray R. M. L., Mozaffarian G., Pearson O. H.*, in: Prolacin and Carcinogenesis (A. R. Boyns and K. Griffiths, eds.), Alpha Omega Alpha, Cardiff, Wales. 1972, p. 158.
52. *Frantz A. G., Habir D. V., Hyman G. A., Suh H. K.*, Clin. Res., *20*, 864 (1972).
53. *Frantz A. G., Habif D. V., Hyman G. A., Suh H. K., Sassin J. F., Zimmerman E. A., Noel G. L., Kleinberg D. L.*, in: Human Prolactin (J. L. Pasteels and C. Robyn, eds.), Excerpta Medica, Amsterdam, 1973, p. 273.
54. *Minton J. P.*, Cancer, *33*, 358 (1974).
55. *Del Pozo E., del Re R. Brun, Varga L., Friesen H. G.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *35*, 768 (1972).
56. *Lemberger L., Crabtree R., Clemens J. A., Dyke R. W., Woodburn R. T.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *39*, 579 (1974).
57. *Heuson J. C., Coume A., Staquet M.*, Eur. J. Cancer, *8*, 155 (1972).
58. *Guerzon P. G., Pearson O. H.*, Clin. Res., *22*, 632A (1974).
59. *Schulz K-D., Czygan P.-J., del Pozo E., Friesen H. G.*, in: Human Prolactin (J. L. Pasteels and C. Robyn, eds.), Excerpta Medica, Amsterdam, 1973, p. 268.

60. *Boyns A. R., Cole E. N., Griffiths K., Roberts M. M., Buchan R., Wilson R. G., Forrest A. P. M.*, Eur. J. Cancer, *9*, 99 (1973).
61. *Wilson R. G., Buchan R., Roberts M. M., Forrest A. P. M., Boyns A. R., Cole E. N.*, Griffiths K., Cancer, 33, 1325 (1974).
62. *Kwa H. G., De Jong-Bakker M., Engelsman E., Cleton F. J.*, Lancet, *i*, 433 (1974).
63. *Franks S., Ralphs D. N. L., Seagroatt V., Jacobs H. S.*, Br. Med. J., *4*, 320 (1974).
64. Boston Collaborative Drug Surveillance Program, Lancet, *ii*, 669 (1974).
65. *Armstrong B., Stevens N., Doll R.*, Lancet, *ii*, 672 (1974).
66. *Heinomen P. P., Shapiro S., Tuminen L.*, Lancet, *ii*, 675 (1974).
67. *Sassin J. F., Frantz A. G., Weitzman E. D., Kapen S.*, Science, *177*, 1205 (1972).
68. *Sassin J. F., Frantz A. G., Kapen S., Weitzman E. D.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *37*, 436 (1973).
69. *Ehni G., Eckles N. E.*, J. Neurosurg., *16*, 628 (1959).
70. *Turkington R. W., Underwood L. E., Van Wyk J. J.*, N. Engl. J. Med., *285*, 707 (1971).
71. *Turkington R. W., Majumder G. C., Kadohama N., MacIndoe J. H., Frantz W. L.*, Recent Prog. Horm. Res., *29*, 417 (1973).
72. *Gill G. N.*, Metabolism, *21*, 571 (1972).
73. *Turkington R. W.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *41*, 1362 (1970).
74. *Birkinshaw M., Falconer I. R.*, J. Endocrinol., *55*, 323 (1972).
75. *Rajaniemi H., Okasanen A., Vanha-Perttula T.*, Hormone Res., *5*, 6 (1974).
76. *Turkington R. W.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *33*, 210 (1971).
77. *Shiu R. P. C., Kelly P. A., Friesen H. G.*, Science, *180*, 968 (1973).
78. *Frantz W. L., MacIndoe J. H., Turkington R. W.*, J. Endocrinol., *60*, 485 (1974).
79. *Shiu R. P. C., Friesen H. G.*, Biochem. J., *140*, 301 (1974).
80. *Costlow M. E., Buschow R. A., McGuire W. L.*, Science, *184*, 85 (1974).
81. *Costlow M. E., Buschow R. A., Richert N. J., McGuire M. L.*, Cancer Res. (1975).
82. *Kelly P. A., Bradley C., Shiu R. P. C., Meites J., Friesen H. G.*, Proc. Sco. Exp Biol. Med., *146*, 816 (1974).
83. *Sasaki G. H., Leung B. S.*, Res. Comm. Chem. Path. Pharm., *8*, 409 (1974.
84. *Vignon F., Rochefort H.*, C. R. Acad. Sci. (Paris), *278*, 103 (1974).
85. *Turkington R. W.*, Cancer Res., *34*, 758 (1974).
86. *Hilf R., Michel I., Bell C.*, Recent Prog. Horm. Res., *23*, 229 (1967).
87. *McGuire W. L.*, Science, *165*, 1013 (1969).
88. *McGuire W. L., Julian J. A., Chamness G. C.*, Endocrinology, *89*, 969 (1971
89. *MsGuire W. L., Huff K., Jennings A. W., Chamness G. C.*, Science, *175*, 335 (1972).
90. *Schorr I., Rathnam P., Saxena B. B., Ney R. L.*, J. Biol. Chem., *246*, 580 (1971).
91. *Lyons W. R., Li C. H., Johnson R. E.*, Recent Prog. Horm. Res., *14*, 219 (195
92. *Ahren K., Jacobsohn D.*, Acta Physiol., Scand., *37*, 190 (1956).
93. *Norgren A.*, Acta Univ. Lund., *II*, 1 (1967).
94. *Nagasawa H., Yanai R.*, Endocrinol. Jap., *18*, 53 (1971).
95. *Meites J., Nicoll C. S.*, Annu. Rev. Physiol., *28*, 57 (1966).
96. *Sterental A., Dominguez J. M., Weissman C., Pearson O. H.*, Cancer Res., 2 481 (1963).
97. *Murota S., Hollander V. P.*, Endocrinology, *89*, 560 (1971).
98. *Caldwell B. V., Tillson S. A., Esber H., Thorneycroft I. H.*, Nature, *231*, 11 (1971).
99. *Pearson O. H., Nasr H.*, Excerpta Medica International Congress Series No 219, Hormonal Steroids, 1970, p. 602.
100. *Nagasawa H., Yanai R.*, Int. J. Cancer, *8*, 463 (1974).

101. *Meites J., Cassell E. E., Clark J. H.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., *137*, 1225 (1971).
102. *Glascock R. F., Hoekstra W. G.*, Biochem. J., *72*, 673 (1959).
103. *Jensen E. V., Jacobson H. I.*, in: Biological Activities of Steroids in Relation io Cancer (G. Pincus and E. P. Vollmer, eds.), Academic Press, New York, 1960, p. 191.
104. *Folca P. J., Glascock R. F., Irvine W. T.*, Lancet, *ii*, 796 (1961).
105. *Pearlman W. H., De Hertogh R., Laumas K. R., Pearlman M. R. S.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *29*, 707 (1969).
106. *Ellis F. G., Berne T. V., Deshpande N., Belzer F. O., Bulbrook R. D.*, Surg. Gynecol. Obstet., *128*, 975 (1969).
107. *James F., James V. H. T., Carter A. E., Irvine W. T.*, Cancer Res., *31*, 1268 (1971).
108. *Braunsberg H., James V. H. T., Irvine W. T., Jamieson C. W., James F., Sellwood R. A., Carter A. E., Hulbert M.*, Lancet, *i*, 163 (1973).
109. *King R. J. B., Cowan D. M., Inman D. R.*, J. Endocrinol., *32*, 83 (1965).
110. *King R. J. B., Gordon J., Cowan D. M., Inman D. R.*, J. Endocrinol., *36*, 139 (1966).
111. *Mobbs B. G.*, J. Endocrinol., *36*, 409 (1966).
112. *Sander S., Attramadal A.*, Acta Pathol. Microbiol. Scand., *74*, 169 (1968).
113. *Terenius L.*, Eur. J. Cancer, *8*, 55 (1972).
114. *Mobbs B. G.*, J. Endocrinol., *44*, 463 (1969).
115. *Jensen E. V., DeSombre E. R., Jungblut P. W.*, in: Endogenous Factors Influencing Host-Tumor Balance (R. W. Wissler, T. L. Dao and S. Wood, Jr., eds.), Univ. Chicago Press, Chicago, 1967, p. 15.
116. *Terenius L.*, Cancer Res., *28*, 328 (1968).
117. *Jensen E. V., DeSombre E. R.*, Annu. Rev. Biochem., *41*, 203 (1972).
118. *Gorski J., Toft D. O., Shyamala G., Smith D., Notides A.*, Recent Prog. Horm. Res., *24*, 45 (1968).
119. *Mueller G. C., Vonderhaar B., Kim U. H., Mahieu M. L.*, Recent Prog. Horm. Res., *28*, 1 (1972).
120. *Chamness G. C., McGuire W. L.*, Biochemistry, *11*, 2466 (1972).
121. *McGuire W. L., De La Garza M.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *37*, 986 (1973).
122. *McGuire W. L., Julian J. A.*, Cancer Res., *31*, 1440 (1971).
123. *MsGuire W. L., Chamness G. C.*, Adv. Exp. Med. Biol., *36*, 113 (1973).
124. *McGuire W. L., Huff K., Chamness G. C.*, Biochemistry, *11*, 4562 (1972).
125. *Chamness G. C., Jennings A. W., McGuire W. L.*, Nature, *241*, 458 (1973).
126. *Chamness G. C., Jennings A. W., MsGuire W. L.*, Biochemistry, *13*, 327 (1974).
127. *Shepherd R. E., Huff K., McGuire W. L.*, Endocrine Res. Commun., *1*, 73 (1974).
128. *McGuire W. L., De La Garza M.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *36*, 548 (1973).
129. *McGuire W. L.*, J. Clin. Invest., *52*, 73 (1973).
130. *MsGuire W. L., Pearson O. H., Segaloff A.*, in: Estrogen Receptors in Human Breast Cancer (W. L. MsGuire, P. P. Carbone and E. P. Vollmer, eds.), Raven Press, New York, 1975.
131. *Feherty P., Farrer-Brown G., Kellie A. E.*, Br. J. Cancer, *25*, 697 (1971).
132. *Wittliff J. L., Hilf R., Brooks W. F., Savlov E. D., Hall T. C., Orlando R. A.*, Cancer Res., *32*, 1983 (1972).
133. *Sander S.*, Acta Pathol. Microbiol. Scand., *74*, 301 (1968).
134. *Johansson H., Terenius L., Thoren L.*, Cancer Res., *30*, 692 (1970).
135. *Korenman S. G., Dukes B. A.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *30*, 639 (1970).
136. *Hähnel R., Twaddle E., Vivian A. B.*, Steroids, *18*, 681 (1971).
137. *Puca G. A., Bresciani F.*, Endocrinology, *85*, 1 (1969).
138. *Wittliff J. L., Gardner D. G., Battema W. L., Gilbert P. J.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., *48*, 119 (1972).
139. *Shyamala G., Nandi S.*, Endocrinology, *91*, 861 (1972).
140. *Hsueh A. J. W., Peck E. J., Clark J. H.*, J. Endocrinol., *58*, 503 (1973).
141. *Katzenellenbogen J. A., Johnson H. J., Carlson K. E.*, Biochemistry, *12*, 4092 (1973).

142. *Truong H., Geynet C., Millet C., Soulignac O., Bucourt R., Vignau M., Torelli V., Baulieu E.-E.*, FEBS Lett., *35*, 289 (1973).
143. *Daehnfeldt J. L.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., *146*, 159 (1974).
144. *Chamness G. C., Huff K., McGuire W. L.*, Steroids, *25*, 627 (1975).
145. *McGuire W. L., Carbone P. P., Sears M. E., Escher G. C.*, in: Estrogen Receptors in Human Breast Cancer (W. L, McGuire, P. P. Carbone and E. P. Vollmer, eds.), Raven Press, New York, in press, 1975.
146. *Terenius L.*, Eur. J. Cancer, *7*, 57 (1971).
147. *Schulz K.-D., Wüstenberg B.*, Horm. Metab. Res., *3*, 295 (1971).
148. *Heuson J. C., Waelbroeck C., Legros N., Gallez G., Robyn C., L'Hermite N.*, Gynecol. Invest., *2*, 130 (1972).
149. *DeSombre E. R., Arbogast L. Y.*, Cancer Res., *34*, 1971 (1974).
150. *Gallez G., Heuson J. C., Waelbroeck C.*, Eur. J. Cancer, *9*, 699 (1973).
151. *Cole M. P., Jones C. T. A., Todd I. D. H.*, Br. J. Cancer, *25*, 270 (1971).
152. *Heuson J. C., Coume A., Staquet M.*, for the E. O. R. T. C. Breast Cancer Group, Eur. J. Cancer, 8, 387 (1972).
153. *Ward H. W. C.*, Br. Med. J., *1*, 13 (1973).
154. *O'Halloran M. J., Maddock P. G.*, J. Irish Med. Assn., *67*, 38 (1974).
155. *Bloom H. J. G., Boesen E.*, Br. Med. J., *2*, 7 (1974).
156. *Clark J. H., Anderson J. N., Peck E J., Jr.*, Steroids, *22*, 707 (1973).
157. *Clark J. H., Peck E. J., Jr., Anderson J. N.*, Nature, *251*, 446 (1974).
158. *Lemon H. M.*, Cancer, *23*, 781 (1969).
159. *Lemon H. M.*, Cancer, *25*, 423 (1970).
160. *Lemon H. M., Miller D. M., Foley J. F.*, NCI Monograph-Prediction of Response in Cancer Therapy, *34*, 77 (1971).
161. *Wotiz H. H., Shane J. A., Vigersky R., Brecher P. I.*, in: Prognostic Factors in Breast Cancer (A. P. M. Forrest and P. B. Kunkler, eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, Md., 1968, p. 368.
162. *Cole P., MacMahon B.*, Lancet, *i*, 604 (1969).
163. *MacMahon B., Cole P., Brown J.* J. Natl. Cancer Inst., *50*, 21 (1973).
164. *Korenman S. G.*, Steroids, *13*, 163 (1969).
165. *Loriaux D. L., Ruder H. J., Knab D. R., Lipsett M. B.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *35*, 887 (1872).
166. *Lipsett M. B.*, Lancet, *ii*, 1378 (1971).
167. *Ruh T. S., Katzenellenbogen B. S., Ketzenellenbogen J. A., Gorski J.*, Endocrinology, *92*, 125 (1973).
168. *Sherman B. M., Korenman S. G.*, Cancer, *33*, 1306 (1974).
169. *Barlow J. J., Emerson K., Jr., Saxena B. N.*, N. Engl. J. Med., *280*, 633 (1969).
170. *Longcope C.*, Am. J. Obstet. Gynecol., *111*, 778 (1971).
171. *Kirrschner M. A., Taylor J. P.*, Clin. Endocrinol. Metab., *35*, 513 (1972).
172. *Grodin J. M., Siiteri P. K., MacDonald P. C.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *36*, 207 (1973).
173. *Judd H. L., Judd G. E., Lucas W. E., Yen S. S. C.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *39*, 1020 (1974).
174. *Lipton A., Santen R J.*, Cancer, *33*, 503 (1974).
175. *Dexter R. N., Fishman L. M., Ney R. L., Liddle G. W.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *27*, 473 (1967).
176. *Cash R., Brough A. J., Cohen M. N. P., Satoh P. S.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *27*, 1239 (1967).
177. *Hall T. C., Barlow J. J., Griffiths C. T., Saba Z.*, Clin. Res., *17*, 402 (1969).
178. *Griffiths C. T., Hall T. C., Saba Z., Barlow J. J., Nevinny H. B.*, Cancer, *32*, 31 (1973).
179. *Santen R. J., Lipton A., Kendall J.*, JAMA, *230*, 1661 (1974).
180. *Huggins C., Yang N. C.*, Science, *137*, 257 (1962).
181. *Huggins C.*, Cancer Res., *25*, 1163 (1965).
182. *McCormick G. M., Moon R. C.*, Eur. J. Cancer, *9*, 483 (1973).
183. *Muggia F. M., Cassileth P. A., Ochoa M., Flatow F. A., Gellhorn A., Hyman G. A.*, Ann. Int. Med., *68*, 328 (1968).
184. Council on Drugs, JAMA, *172*, 1271 (1960).

185. *Growley L. G., MacDonald I.*, Cancer, *18*, 436 (1965).
186. *Stoll B. A.*, Br. Med. J., *3*, 338 (1967).
187. *Stoll B. A.*, Br. Med. J., *1*, 150 (1967).
188. *Stoll B. A.*, *Cancer*, *20*, 1807 (1967).
189. *Sadoff L., Lusk W.*, Obstet. Gynecol., *43*, 262 (1974).
190. *Landau R. L., Ehrlich E. N., Huggins C.*, JAMA, *182*, 632 (1962).
191. *Kennedy B. J.*, Cancer, *18*, 1551 (1965).
192. *Kennedy B. J., French L.*, Am. J. Surg., *110*, 411 (1965).
193. *Wichmann K.*, Acta Endocrinol. [Suppl.] (Kbh.), *55*, 116 (1967).
194. *Bryson M. J., Sweat M. L.*, Endocrinology, *81*, 729 (1967).
195. *Bryson M. J., Sweat M. L.*, Endocrinology, *84*, 1071 (1969).
196. *Armstrong D. T., King E. R.*, Endocrinology, *89*, 191 (1971).
197. *Milgrom E., Baulieu E.-E.*, Endocrinology, *87*, 276 (1970).
198. *Hashimoto I., Hendricks D. M., Anderson L. L., Melampy R. M.*, Endocrinology, *82*, 333 (1968).
199. *Howard P. D., Wiest W. G.*, Steroids, *19*, 35 (1972).
200. *Laumas K. R., Faroog A.*, J. Endocrinol., *36*, 95 (1966).
201. *Laumas K. R., Faroog A.*, Indian J. Exp. Biol., *5*, 12 (1967).
202. *Falk R. J., Bardin C. W.*, Endocrinology, *86*, 1059 (1970).
203. *Saffran J., Loeser B. K., Haas B. M., Stavely H. E.*, Steroids, *24*, 839 (1974).
204. *Egert D., Maass H.*, Acta Endocrinol., (Kbh.), *77*, 135 (1974).
205. *Egert D., Jonat W., Maass H.*, Acta Endocrinol. (Kbh.), *77*, 150 (1974).
206. *Egert D., Maass H.*, Acta Endocrinol. (Kbh.), *77*, 160 (1974).
207. *Wiest W. G.*, in: The Sex Steroids (K. W. McKerns, ed.), Appleton-Century-Crofts, New York, 1971, Chap. 10.
208. *Collins J. A., Jewkes D. M.*, Am. J. Obstet. Gynecol., *118*, 179 (1974).
209. *Lawson D. E. M., Pearlman W. H.*, J. Biol. Chem., *239*, 3226 (1964).
210. *Chatterton R. T.*, in: The Sex Steroids (K. W. McKerns, ed.), Appleton-Century-Crofts, New York, 1971, Chap. 12.
211. *Podratz K. C., Munns T. W., Katzman P. A.*, Steroids, *24*, 775 (1974).
212. *Tabei T., Haga H., Heinrichs W. L., Herrmann W. L.*, Steroids, *23*, 651 (1974).
213. *O'Malley B. W., McGuire W. L., Kohler P. O., Korenman S. G.*, Recent Prog. Horm. Res., *25*, 105 (1969).
214. *Morgan M. D., Wilson J. D.*, J. Biol. Chem., *245*, 3781 (1970).
215. *Strott C. A.*, Endocrinology, *95*, 826 (1974).
216. *Milgrom E., Atger M., Baulieu E.-E.*, Steroids, *16*, 741 (1970).
217. *Falk R. J., Bardin C. W.*, Endocrinology, *86*, 1059 (1970).
218. *Milgrom E., Atger M., Perrot M., Baulieu E.-E.*, Endocrinology, *90*, 1071 (1972).
219. *Milgrom E., Perrot M., Atger M., Baulieu E.-E.*, Endocrinology, *90*, 1064 (1972).
220. *Corvol P., Falk R. J., Freifeld M. L., Bardin C. W.*, Endocrinology, *90*, 1464 (1972).
221. *Faber L. E., Sandmann M. L., Stavely H. E.*, J. Biol. Chem., *247*, 8000 (1972).
222. *Milgrom E., Thi L., Atger M., Baulieu E.-E.*, J. Biol. Chem., *248*, 6366 (1973).
223. *Atger M., Baulieu E.-E., Milgrom E.*, Endocrinology, *94*, 161 (1974).
224. *Warembourg M.*, Endocrinology, *94*, 665 (1974).
225. *Sar M., Stumpf W. E.*, Endocrinology, *94*, 1116 (1974).
226. *MacLaughlin D. T., Westphal U.*, Biochim. Biophys. Acta, *365*, 372 (1974).
227. *Kontula K., Jänne O., Rajakoski E., Tanhuapää E., Vihko R.*, J. Steroid Biochem., *5*, 39 (1974).
228. *Freifeld M. L., Feil P. D., Bardin C. W.*, Steroids, *23*, 93 (1974).
229. *Philibert D., Raynaud J.-P.*, Endocrinology, *94*, 627 (1974).
230. *Leavitt W. W., Toft D. O., Strott C. A., O'Malley B. W.*, Endocrinology, *94*, 1041 (1974).
231. *Leavitt W. W., Grossman C. J.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, *71*, 4341 (1974).
232. *Reel J. R., Van Dewark S. D., Shih Y., Callantine M. R.*, Steroids, *18*, 441 (1971).

233. *MsGuire J. L., Bariso C. D.*, Endocrinology, *90*, 496 (1972).
234. *Faber L. E., Sandmann .M L., Stavely H. E.*, J. Biol. Chem., *247*, 5648 (1972).
235. *Faber L. E., Sandmann M. L., Stavely H. E.*, Endocrinology, *93*, 74 (1973).
236. *Rao B. R., Wiest W G., Allen W. M.*, Endocrinology, *92*, 1229 (1973).
237. *Davies I. J., Challis J. R. G., Ryan K. J.*, Endocrinology, *95*, 165 (1974).
238. *Feil P. D., Glasser S. R., Toft D. O., O'Malley B. W.*, Endocrinology, *91*, 738 (1972).
239. *Philibert D., Raynaud J.-P.*, Steroids, *22*, 89 (1973).
240. *McGuire J. L., DeDella C.*, Endocrinology, *88*, 1099 (1971).
241. *Milgrom E., Baulieu E.-E.*, Endocrinology, *87*, 276 (1970).
242. *Davies I. J., Ryan K. J.*, Endocrinology, *90*, 507 (1972).
243. *Davies I. J., Ryan K. J.*, Endocrinology, *92*, 394 (1973).
244. *Saffran J., Loeser B. K., Haas B. M., Stavely H. E.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., *53*, 202 (1973).
245. *Hsueh A. J. W., Peck E. J., Jr., Clark J. H.*, *24*, 599 (1974).
246. *John P. N., Rogers A. W.*, J. Endocrinol., *53*, 375 (1972).
247. *Stumpf W. E., Sar M.*, J. Steroid Biochem., *4*, 477 (1973).
248. *Verma V., Laumas K. R.*, Biochem. Biophys. Acta, *317*, 403 (1973).
249. *Batra S.*, J. Endocrinol., *57*, 561 (1973).
250. *Kontula K., Jänne O., Luukkainen T., Vihko R.*, Biochim. Biophys. Acta, *328*, 145 (1973).
251. *Haukkamaa M.*, J. Steroid Biochem., *5*, 73 (1974).
252. *Smith H. E., Smith R. G., Toft D. O., Neergaard J. R., Burrows E. P., O'Malley B. W.*, J. Biol. Chem., *249*, 5924 (1974).
253. *Guérigvian J. L., Sawyer M. E., Pearlman W. H.*, J. Endocrinol., *61*, 331 (1974).
254. *Rao B. R., Wiest W. G., Allen W. M.*, Endocrinology, *95*, 1275 (1974).
255. *Young P. C. M., Cleary R. E.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *39*, 425 — (1974).
256. *Horwitz K. B., McGuire W. L.*, Steroids, *25*, 497 (1975).
257. *Terenius L.*, Eur. J. Cancer, *9*, 291 (1973).
258. *Horwitz K. B., McGuire W. L., Pearson O. H., Segaloff A.*, Science, *189*, 726 (1975).
259. *Thatcher W. W., Tucker H. A.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., *134*, 915 (1970).
260. *Thatcher W. W., Tucker H. A.*, Endocrinology, *86*, 237 (1971).
261. *Oka T., Topper Y. J.*, J. Biol. Chem., *246*, 7701 (1971).
262. *King R. J. B., Mainwaring W. I. P.*, in: Steroid'Cell Interactions, University Park, Baltimore, Md., 1974.
263. *Munck A., Wira C.*, in: Advances in the Biosciences, Vol. 7 (G. Raspé, ed.), Pergamon-Vieweg, Oxford, 1970, p. 301.
264. *Hollander N., Chiu Y. W.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *25*, 291 (1966).
265. *Baxter J. D., Harris A. W., Tomkins G. M., Cohn M.*, Science, *171*, 189 (1971).
266. *Lippman M., Halerman R., Perry S., Leventhal B., Thompson E. B.*, Nature [New Bnol.], *242*, 157 (1973).
267. *Sibley C. H., Tomkins G. M.*, Cell, *2*, 221 (1974).
268. *Gehring U., Tomkins G. M.*, Cell, *3*, 301 (1974).
269. *Yamamoto K. R., Stampfer M. R., Tomkins G. M.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. *71*, 3901 (1974).
270. *Sparks L. L., Daane T. A., Hayashida T., Cole R. D., Lyons W. R., Li C. H.*, Cancer, *8*, 271 (1955).
271. *Hilf R., Michel I., Bell C., Freeman J. J., Borman A.*, Cancer Res., *25*, 286 (1965).
272. *Kornel L.*, Acta Endocrinol. [Suppl.] (Kbh.), *74*, 178 (1973).
273. *Pihl A., Sander S., Brennhovd I., Olsnes S.*, in: Estrogen Receptors in Human Breast Cancer (W. L. McGuire, P. P. Carbone and E. P. Vollmer, eds.), Raven Press, New York, 1975.
274. *Lipsstt M. P.*, Ann. NY Acad. Sci., *230*, 489 (1974).
275. *Gardner D. G., Wittliff J. L.*, Br. J. Cancer, *27*, 441 (1973).
276. *Shyamala G.*, J. Biol. Chem., *249*, 2160 (1974).
277. *Tucker H. A., Larson B. L., Gorski J.*, Endocrinology, *89*, 152 (1971).

278. *Shyamala G.*, Biochemistry, *12*, 3085 (1973).
279. *Gardner D. G., Wittliff J. L.*, Biochim. Biophys. Acta, *320*, 617 (1973).
280. *Baulieu E.-E.*, Ann. Clin. Res., *2*, 246 (1970).
281. *Bullock L. P., Bardin C. W.*, Endocrinology, *94*, 746 (1974).
282. *Bullock L. P., Bardin C. W.*, Steroids, *25*, 107 (1975).
283. *Gehring U., Tomkins G. M., Ohno S.*, Nature [New Biol.], *232*, 106 (1971).
284. *Attardi B., Ohno S.*, Cell, *2*, 205 (1974).
285. *Bullock L. P., Bardin C. W.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *35*, 935 (1972).
286. *Bullock L. P., Bardin C. W.*, J. Steroid. Biochem., *4*, 139 (1973).
287. *Imperato-McGinley J., Guerrero L., Gautier T., Peterson R. E.*, Science, *186*, 1213 (1974).
288. *Mainwaring W. I. P., Mangan F. R.*, J. Endocrinol., *59*, 121 (1973).
289. *Shain S. A., Axelrod L. R.*, Steroids, *21*, 801 (1973).
290. *Jung I., Baulieu E.-E.*, Biochimie, *53*, 807 (1971).
291. *Sullivan J. N., Strott C. A.*, J. Biol. Chem., *248*, 3202 (1973).
292. *Bruchovsky N., Craven S.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *62*, 837 (1975).
293. *Moore R. J., Wilson J. D.*, Endocrinology, *93*, 581 (1973).
294. *Lee D. K. H., Bird C. E., Clark A. F.*, Steroids, *22*, 677 (1973).
295. *Liao S., Howell D. K., Chang T.-M.*, Endocrinology, *94*, 1205 (1974).
296. *Peets E. A., Henson M. F., Neri R.*, Endocrinology, *94*, 532 (1974).
297. *Terenius L.*, Steroids, *23*, 909 (1974).
298. *Mowszowicz I., Bieber D. E., Chung K. W., Bullock L. P., Bardin C. W.*, Endocrinology, *95*, 1589 (1974).
299. *Furth J.*, Fed. Proc., *20*, 865 (1961).
300. *Heise E., Görlich M.*, Br. J. Cancer, *20*, 539 (1966).
301. Cooperative Breast Cancer Group, JAMA, *188*, 1069 (1964).
302. *Goldenberg I. S., Waters M. N., Ravdin R. S., Ansfield F. J., Segaloff A.*, JAMA, *223*, 1267 (1973).
303. *Volk H., Deupree R. H., Goldenberg I. S., Wilde R. C., Carabasi R. A., Escher G. C.*, Cancer, *33*, 9 (1974).
304. *Lyon M. E., Glenister P. H.*, Nature, *247*, 366 (1974).
305. *Ohno S., Christian L., Attardi B.*, Nature [New Biol.], *243*, 119 (1973).
306. *Kratochwil K.*, J. Embryol. Exp. Morphol., *25*, 141 (1971).
307. *Elger W., Neumann F.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., *123*, 637 (1966).
308. *Neumann F., Elger W.*, J. Endocrinol., *36*, 347 (1966).
309. *Wagner R. K., Görlich L., Jungblut P. W.*, Acta Endocrinol. [Suppl.] (Kbh.), *173*, 65 (1973).
310. *Miller W. R., McDonald D., Forrest A. P. M., Shivas A. A.*, Lancet, *i*, 912 (1973).
311. *Raith L., Wirtz A., Wiedemann M., Karl H. J.*, Acta Endocrinol. [Suppl.] (Kbh.), *177*, 28 (1973).
312. *Jenkins J. S., Ash S.*, Lancet, *ii*, 513 (1972).
313. *Bruchovsky N., Meakin J. W.*, Cancer Res., *33*, 1689 (1973).
314. *Smith J. A., King R. J. B.*, Exp. Cell Res., *73*, 357 (1972).
315. *Quadri S. K., Kledzik G. S., Meites J.*, J. Natl. Cancer Inst., *52*, 875 (1974).
316. *Kalra P. S., Fawcett C. P., Krulich L., McCann S. M.*, Endocrinology, *92*, 1256 (1973).
317. *Giannopoulos G.*, J. Biol. Chem., *248*, 1004 (1973).
318. *Rochefort H., Lignon F., Capony F.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *47*, 662 (1972).

Глава 13

# РЕЦЕПТОРЫ 1$\alpha$, 25-ДИОКСИВИТАМИНА $D_3$ В КИШЕЧНИКЕ

*М. ХОСЛЕР И П. БРУМБО*

Department of Biochemistry
College of Medicine, Uiversity of Arizona
Tucson, Arizona

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Принято считать, что витамин D предотвращает развитие рахита, поддерживая на должном уровне концентрацию кальция и фосфора в сыворотке. Стерин витамин D осуществляет это действие, стимулируя всасывание кальция и фосфора из кишечника и (совместно с паратгормоном) резорбцию минеральных компонентов костей [1]. За последние годы установлено, что витамин D служит предшественником ряда биологически активных метаболитов. Витамин $D_3$[1] подвергается последовательному гидроксилированию, приводящему к появлению 25-окиси- и 1$\alpha$, 25-диоксипроизводных. Образование 25-оксивитамина $D_3$ (25-OH-$D_3$)[2] происходит в печени, кишечнике и почках [2, 3]. В то же время дальнейшая активация стерина до 1$\alpha$, 25-диоксивитамина $D_3$[1$\alpha$, 25-$(OH)_2$-$D_3$], считающегося гормональной формой витамина, происходит исключительно в почках [4]. На рис. 1 показаны пути метаболизма витамина $D_3$. 25-OH-$D_3$ может превращаться по крайней мере в два метаболита, отличных от 1$\alpha$, 25-$(OH)_2$-$D_3$: 24, 25-диоксивитамин $D_3$ и 25, 26-диоксивитамин $D_3$. Физиологическое значение этих двух диоксивитаминов D пока не ясно; возможно, они являются первыми продуктами катаболизма 25-OH-$D_3$ [5].

---

[1] Витамин $D_3$, или холекальциферол, Комиссией по номенклатуре в биологической химии Международного союза фундаментальной и прикладной химии определяется как стерин; его химическое наименование 9,10-секо-5, 7, 10 (19)-холестатриен-3$\alpha$-ол.

[2] Принятые в этой главе обозначения: 25-OH-$D_3$ — 25-оксивитамин $D_3$; 1$\alpha$-OH-$D_3$—1$\alpha$-оксивитамин $D_3$; 1$\alpha$, 25-$(OH)_2$-$D_3$—1$\alpha$, 25-диоксивитамин $D_3$; 24, 25-$(OH)_2$-$D_3$—24, 25-диоксивитамин $D_3$; 25, 26-$(OH)_2$-$D_3$—25, 26-диоксивитамин $D_3$; 1$\alpha$, 24, 25-$(OH)_3$-$D_3$—1$\alpha$, 24, 25-триоксивитамин $D_3$; 5,6-*транс*-25-OH-$D_3$—5,6-*транс*-25-оксивитамин $D_3$; 24-нор-25-OH-$D_3$ — 24-нор-25-оксивитамин $D_3$; 26, 27-биснор-25-OH-$D_3$ — 25, 26-биснор-25-оксивитамин $D_3$; 27-нор-5, 6-*транс*-25-OH-$D_3$ — 27-нор-5, 6-*транс*-25-оксивитамин $D_3$; 25-OH-$D_2$ — 25-оксивитамин $D_2$; 1$\alpha$, 25-$(OH)_2$-$D_2$—1$\alpha$, 25-диоксивитамин $D_2$; CaCБ — кальцийсвязывающий белок.

Данные самого различного рода свидетельствуют о том, что 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ является активной формой витамина $D_3$. 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ — наиболее эффективная форма витамина по способности стимулировать мобилизацию кальция у интактных животных [6, 7], в органной культуре кишечника [8] и в культуре эмбриональной кости [9]. Кроме того, хроническое введение этого со-

HO 24, 25-$(OH)_2D_3$
Почки
Печень
Кишечник
Почки
HO Витамин $D_3$ ($D_3$)
HO 25-$OHD_3$
Фермент
почек
HO OH 1α, 25-$(OH)_2D_3$
HO 25, 26-$(OH)_2D_3$

**Рис. 1. Метаболизм витамина $D_3$.**

единения животным, содержащимся на лишенной витамина D диете, полностью предотвращает развитие всех радиологических и гистологических признаков рахита [10, 11]. Таким образом 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ нормализует метаболизм кальция и фосфора, развитие кости и, по-видимому, выполняет все те функции, которые приписываются витамину D. Знание точного молекулярного механизма действия 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ на тонкий кишечник и скелет чрезвычайно важно для понимания минерального гомеостаза у животных и для выяснения патофизиологии некоторых метаболических заболеваний костей у человека.

Работы, посвященные выяснению последовательности событий, приводящих к действию стероидных гормонов на клетки-мишени, указывают, что первичным местом действия гормонов является клеточное ядро [12]. Многочисленные эксперименты подтверждают предположение о том, что стероидные гормоны регулируют функционирование клеток, оказывая влияние на синтез различных белков в органах-мишенях. Исследования последних лет доказывают, что этот эффект опосредуется стимуляцией синтеза мРНК, кодирующих специфичные для данной клетки белки [13]. Полученные в последнее время данные свидетельствуют о том, что 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ действует аналогично стероидным гормонам, способствуя реализации генетической информации, что в конечном итоге приводит к образованию специфических белковых продуктов, осуществляющих транспорт кальция в кишечнике и кости [5]. Было показано, что стимулирующее действие 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ на транспорт кальция у интактных животных чувствительно к ингибиторам транскрипции, таким, как актиномицин D [14], а в органной культуре кишечника и к актиномицину D, и к α-аманитину [15]. Кроме того, при введении 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ цыплятам, содержащимся на диете с недостатком витамина D, происходит быстрая стимуляция ядерной ДНК-зависимой РНК-полимеразы II, катализирующей синтез мРНК [16]. Кроме действия на ядерный метаболизм РНК, 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ индуцирует в слизистой кишечника цыплят синтез кальцийсвязывающего белка (CaСБ) [17, 18], что было показано с помощью антител к CaСБ. И, наконец, в ответ на введение витамина $D_3$ цыплятам, содержащимся на диете с недостатком витамина D, наблюдается увеличение активности мРНК полисом, специфически транслируемой in vitro в CaСБ кишечника [19].

В ранних работах по изучению субклеточного распределения физиологических доз $^3$H-витамина $D_3$ с относительно низкой удельной радиоактивностью у цыплят, содержавшихся на обедненной витамином $D_3$ диете, было показано, что радиоактивность накапливается преимущественно в клеточных ядрах слизистой кишечника [20]. Хослер и др. [21] сообщили, что биологически активный метаболит витамина $D_3$, пик 4 B, локализуется во фракции хроматина ядер слизистой кишечника. Пик 4 B (позднее идентифицированный Холиком и др. [22] как 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$) экстрагировали из хроматина кишечника растворами с высокой концентрацией соли и с высокими (но не низкими) значениями pH, после чего полученный экстракт центрифугировали в CsCl. В результате этих экспериментов было сделано предположение, что гормон связан с каким-то негистоновым хромосомным белком [23]. Таким образом, основополагающие эксперименты, в которых использовалось субфракционирование клеток ткани-мишени после введения витамина D, показали, что возможным местом действия гормона 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ является клеточное ядро [24].

В настоящее время появились препараты 1α,25-$(OH)_2$-$^3H$-$D_3$ с высокой удельной радиоактивностью. Это дает возможность выяснить, функционирует ли данный стерин аналогично стероидным гормонам, с помощью так называемого двухступенчатого механизма, характерного, возможно, для взаимодействия всех стероидных гормонов с внутриклеточными рецепторами [12]. Согласно этой гипотезе, гормон, проникнув в клетку-мишень, обратимо взаимодействует с внутриклеточным (растворимым) белком, который имеется только в органе-мишени. Связывание гормона с цитоплазматическим рецептором сопровождается зависимым от температуры перемещением стероида из цитоплазмы в ядро, где он связывается с хроматином. Были идентифицированы внутриклеточные белки, связывающие эстрогены [12], прогестерон [13], андрогены [25], альдостерон [26] и кортизол [27].

Рассматриваемые в настоящей главе эксперименты были посвящены изучению ранних событий во взаимодействии 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ с его органом-мишенью — кишечником. Основополагающий принцип работы, которая будет здесь представлена, сводится к тому, что путем изучения специфического связывания 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ субклеточными компонентами органа-мишени in vitro можно получить прямые данные о способе действия данного гормона. В этих исследованиях в качестве главного допущения принимается, что в органе-мишени для 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ содержится ограниченное количество специфических рецепторных мест, избирательно захватывающих гормон. Поэтому точное выяснение внутриклеточной локализации рецепторных мест помогло бы понять, каким образом 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ осуществляет свое действие на транспорт кальция. Кроме того, это показало бы, взаимодействует ли активная форма витамина с клеткой-мишенью с помощью постулированного «двухступенчатого механизма». В данной работе вопрос о возможном прямом участии предполагаемых рецепторов 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ в молекулярном механизме транспорта кальция рассматриваться не будет. Здесь лишь делается вывод, что описанные связывающие компоненты для стеринового гормона — это рецепторы 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$, поскольку они проявляют свойства, характерные для рецепторов гормонов. К этим свойствам относятся гормональная специфичность, ограниченность количества связывающих мест и достаточно высокое сродство к гормону, обеспечивающее задержку гормона при его физиологических концентрациях. Кроме того, связывание гормона рецепторами предшествует по времени физиологическому ответу на гормон. Используя в данной главе термин «рецептор», мы будем помнить, что действительное участие рецепторов в молекулярных механизмах действия 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ остается недоказанным.

## II. СУБКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ 1α, 25-ДИОКСИВИТАМИНА $D_3$ В КИШЕЧНИКЕ

В предшествующих работах по субклеточному распределению витамина $D_3$ и его метаболитов после введения радиоактивного витамина $D_3$ животным с рахитом было обнаружено, что 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ локализуется во фракции ядерного хроматина слизистой кишечника [21]. Теперь, когда стало доступным ферментативное получение тритированного 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ из коммерческого препарата 25-OH-$^3$H-$D_3$, появилась возможность прямого изучения тканевого и субклеточного распределения данного гормонального стерина.

### А. Связывание хроматином ядер in vivo

В табл. 1 приведены данные по субклеточному распределению 1α,25-$(OH)_2$-$^3$H-$D_3$ в кишечнике цыплят с рахитом через 2 ч после введения физиологической дозы гормона. Основная доля гормона обнаруживается в ядерной фракции, причем большая часть радиоактивности остается связанной с хроматином после его выделения из ядер. Сходные результаты впервые были получены Цаем и Норманом [29]. Все эти данные подтверждают мнение, что главным субклеточным компонентом, связывающим 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$, является хроматин.

*Таблица 1*

**Субклеточное распределение 1α, 25-$(OH)_2$-$^3$H-$D_3$ в кишечнике [1]**

| Фракция | Количество стерина на фракцию у одного цыпленка, пмоль[2] | Суммарное содержание, % |
|---|---|---|
| Неочищенные ядра | 26 | 74 |
| Хроматин[3] | 15[3] | 43[3] |
| Митохондрии | 3 | 9 |
| Микросомы | 2 | 6 |
| Цитозоль | 4 | 11 |

[1] Цыплята с рахитом получали per os 390 пмоль стерина (0,36 Ки/ммоль) за 2 ч до забоя.
[2] Фракционировали 3 г слизистой кишечника (что эквивалентно 15 мг ДНК)
[3] Хроматин получали как субфракцию неочищенных ядер; поправку на выход ДНК (составлявший приблизительно 85%) не вносили

### Б. Корреляция между связыванием с хроматином и биологическим ответом

Для того чтобы определить, принадлежит ли взаимодействию 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ с рецепторами хроматина важная роль в биологи-

ческом действии гормона, были проведены эксперименты по изучению кинетики стимулируемых гормоном процессов и их зависимости от дозы стерина. На рис. 2 связывание 1α,25-$(OH)_2$-$^3H$-$D_3$ с рецепторами хроматина во времени сопоставляется со стимуляцией этим гормоном транспорта кальция во времени. При дозе 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ 390 пмоль связывание гормона рецепторами хро-

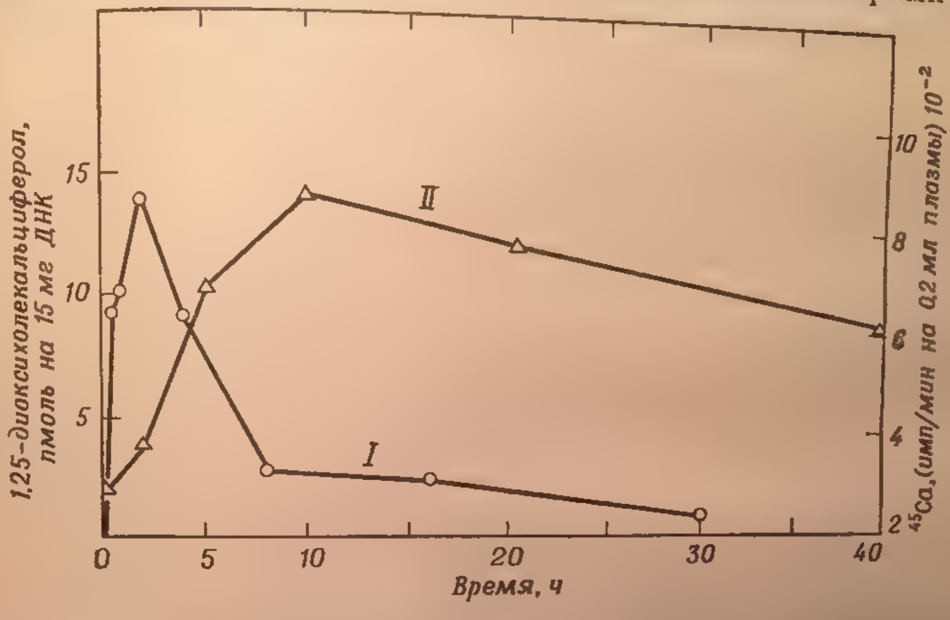



**Рис. 2.** Изменения во времени связывания 1α, 25-$(OH)_2$-$^3H$-$D_3$ рецепторами хроматина кишечника (*I*) и стимуляции абсорбции кальция в кишечнике (*II*) после перорального введения гормона [28] (с разрешения Американского общества биохимиков).

матина достигает максимума через 2 ч — т. е. за 8 ч до развития максимального действия на всасывание кальция. Однако самое удивительное состоит, вероятно, в том, что через 8 ч после введения этой дозы гормона рецепторные места оказываются уже почти полностью лишенными лиганда. И наоборот, уже в первые 30 мин наблюдается значительное связывание 1α,25-$(OH)_2$-$^3H$-$D_3$ рецепторами хроматина, тогда как запуск механизма транспорта кальция происходит на 1,5—2 ч позже. Таким образом, начало стимулирующего действия 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ на всасывание кальция и развитие максимального эффекта имеет место через 2 и 8 ч соответственно после локализации гормона в хроматине кишечника. Кинетика связывания 1α,25-$(OH)_2$-$^3H$-$D_3$ с хроматином свидетельствует о том, что гормон-рецепторное взаимодействие относится к ранним событиям — условие, необходимое для участия рецепторов в первичном физиологическом ответе.

Введением цыплятам с рахитом различных доз меченого витамина $D_3$ можно обнаружить насыщаемость связывания 1α-$(OH)_2$-$D_3$ хроматином кишечника. Через 15 ч максимальное содержание 1α, 25-$(OH)_2$-$D_3$ в хроматине, равное 10 пмоль, дости-

галось после введения 20 МЕд (1300 пмоль) витамина $D_3$ (рис. 3, *А*). Стимуляция всасывания кальция (рис. 3, *Б*), измеренная in vivo через 40 ч после введения возрастающих доз витамина $D_3$, также была максимальной при дозе 20 МЕд (1300 пмоль). Цай и Норман [29] тоже обнаружили совпадение дозы 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$, необходимой для насыщения хроматина, и количества стерина, вызывающего максимальное всасывание кальция в кишечнике. Это

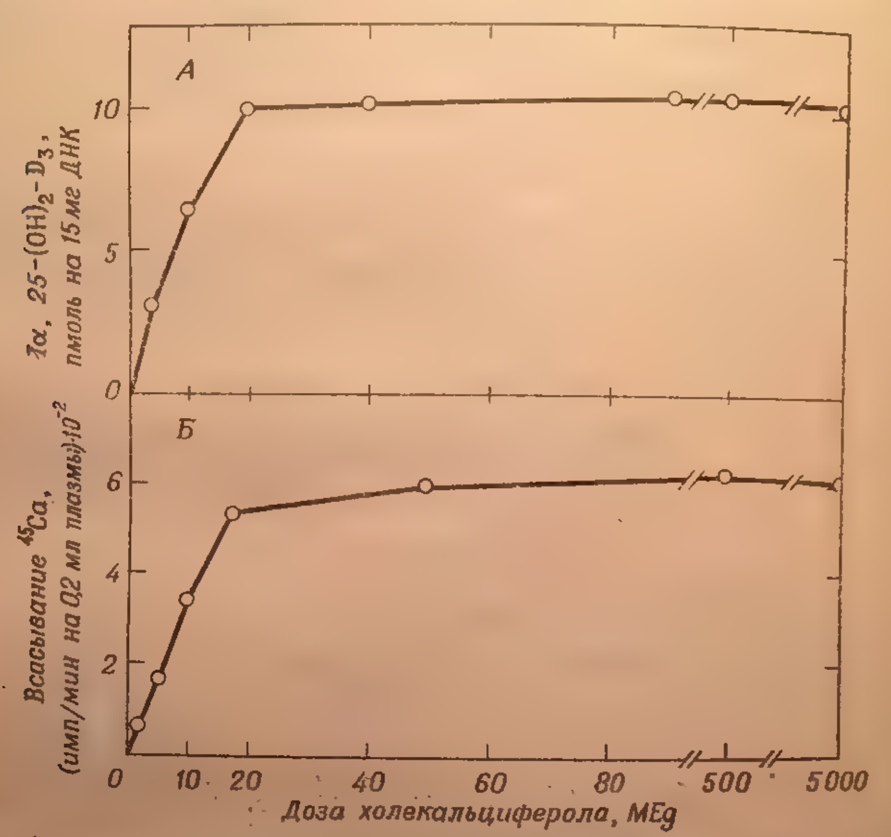



**Рис. 3.** Корреляция между насыщением хроматина слизистой кишечника 1α,25-$(OH)_2$-$^{14}C$-$D_3$ после введения возрастающих доз $^{14}C$-витамина $D_3$ и увеличением всасывания кальция [28] (с разрешения Американского общества биохимиков).

соответствие между связыванием 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ хроматином и физиологическим эффектом витамина D позволяет думать, что между связыванием гормона рецепторной системой хроматина и стимулирующим действием того же гормона на транспорт кальция в кишечнике имеется причинная связь.

## В. Связывание с хроматином in vitro

Для выяснения пути молекул гормона к хроматину кишечника и характеристики вероятных рецепторных белков с высоким сродством к гормону было необходимо разработать метод для изучения связывания гормонов in vitro. Можно инкубировать 1α,25-$(OH)_2$-$^3H$-$D_3$ высокой удельной радиоактивности (6—

9,9 Ки/ммоль) с цельной тканью кишечника, ее гомогенатом или реконструированной системой субклеточных компонентов. Инкубация радиоактивного 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ с цельной тканью или ее гомогенатом при 25° С в течение приблизительно 30 мин приводит к значительному связыванию гормона с компонентами клетки. Субклеточное фракционирование показало, что, так же как и в опытах in vivo (табл. 1), гормон локализуется преимущественно в ядре.

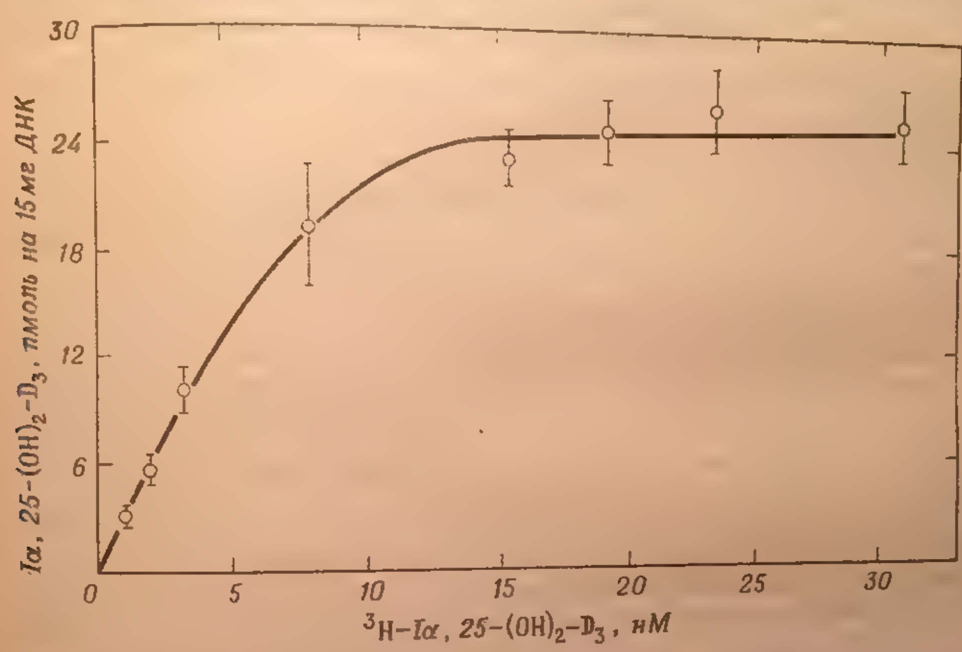



**Рис. 4.** Насыщение связывающих 1α, 25-$(OH)_2$-$D_3$ мест хроматина после инкубации гомогената слизистой кишечника с возрастающими количествами 1α, 25-$(OH)_2$-$^3H$-$D_3$ (0,36 Ки/ммоль) [28] (с разрешения Американского общества биохимиков).

Связывание стерина хроматиновой фракцией ядер, как видно из рис. 4, в данной системе in vitro является насыщаемым, что свидетельствует об ограниченности числа мест связывания 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$. Таким образом, избирательное накопление гормона в хроматине можно получить in vitro при концентрациях 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ от 1 до 10 нМ. Ранее было обнаружено, что при инкубации столь низких концентраций других стеринов, таких, как 25-OH-$D_3$, витамин $D_3$ и 17β-эстрадиол, их связывания хроматином кишечника не происходит [28]. Однако лучшим методом изучения специфичности взаимодействия гормона с хроматином являются конкурентные исследования с использованием различных нерадиоактивных аналогов 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ и витамина D, ставших в последнее время вполне доступными.

## Г. Конкурентные исследования с использованием аналогов гормона

На рис. 5 приведены структурные формулы стеринов с биологической активностью витамина D, полученных в нескольких лабораториях. Эти аналоги делятся на два основных типа: а) вещества, отличающиеся по количеству и положению гидроксильных групп в молекуле стерина; б) вещества, в которых модификации затрагивают боковую цепь молекулы стерина. Изучая взаимодействие с рецепторами аналогов $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$, *лишенных* либо одной (например, $1\alpha\text{-}OH\text{-}D_3$; $25\text{-}OH\text{-}D_3$; 5,6-транс-$25\text{-}OH\text{-}D_3$), либо двух из трех гидроксильных групп (например, витамин $D_3$ или дигидротахистерин$_2$), можно выявить значение этих функциональных групп. Точно так же использование соединений со структурными изменениями, затрагивающими боковую цепь (например, 24-нор-$25\text{-}OH\text{-}D_3$; 26,27-биснор-$25\text{-}OH\text{-}D_3$; 27-нор-5,6-*транс*-$25\text{-}OH\text{-}D_3$), позволяет выяснить роль окружения 25-гидроксильной группы для связывания рецепторами. Следует, очевидно, изучить и другой метаболит витамина D: $24,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ (рис. 1). Это дает возможность понять биологическое значение данного стерина в кишечнике и использо-

*Таблица 2*

**Относительное сродство аналогов 1α, 25-диоксивитамина $D_3$ к рецепторной системе хроматина кишечника**

| Стерин | Относительное сродство | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1α, 25-диоксивитамин $D_3$ (полученный биологическим методом) | 1 | — | — | — |
| 1α, 25-диоксивитамин $D_3$ (синтезированный химически)[1] | 1 | — | — | — |
| 5,6-*транс*-25-оксивитамин $D_3$ | 1/100 | 1 | — | — |
| 25-оксивитамин $D_3$ | 1/500 | — | 1 | — |
| 27-нор-5,6-*транс*-25-оксивитамин $D_3$[2] | 1/600 | 1/6 | — | — |
| 1α-оксивитамин $D_3$[3] | 1/800 | — | — | — |
| 24R, 25-диоксивитамин $D_3$[1] | 1/800 | — | — | 1 |
| 24-нор-25-оксивитамин $D_3$[2] | 1/3 500 | — | 1/7 | — |
| 24S, 25-диоксивитамин $D_3$[1] | 1/17 000 | — | — | 1/21 |
| 26, 27-биснор-25-оксивитамин $D_3$[2] | 1/18 000 | — | 1/39 | — |
| Витамин $D_3$ | ~1/100 000 | — | — | — |
| Дигидротахистерин$_2$ | 1/100 000 | — | — | — |

[1]) Любезно предоставлен д-ром М. Р. Ускоковичем. Hoffman-La Roche Inc.

[2]) Нерадиоактивные стерины, любезно предоставленные д-ром М. Ф. Холиком и д-ром Г. Ф. ДеЛюком.

[3]) $1\alpha\text{-}OH\text{-}D_3$ любезно предоставлен д-ром М. М. Пеше.

Витамин $D_3$; $R_1 = R_2 = H-$

$1\alpha$-OH-$D_3$; $R_1 = OH, R_2 = H$

25-OH-$D_3$; $R_1 = H, R_2 = OH$

$1\alpha$, 25-$(OH)_2$-$D_3$; $R_1 = OH, R_2 = OH$

*Дигидротахистерин$_2$*

*5, 6-транс-25-OH-$D_3$*

*24-нор-25-OH-$D_3$* *26,27-биснор-25-OH-$D_3$* *27-нор-5, 6-транс-25-OH-$D_3$*

**Рис. 5.** Строение витамина $D_3$ и его биологически активных аналогов.

вать его в качестве инструмента при выяснении влияния гидроксилирования вблизи от 25-гидроксильной группы.

Сведенные в табл. 2 результаты экспериментов in vitro были получены путем инкубации $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}^3H\text{-}D_3$ и немеченных аналогов с реконструированной системой цитозоль — хроматин. Для того чтобы получить связывание $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ с хроматином in

vitro, система должна содержать и цитозольную, и хроматиновую фракции кишечника (об этом речь пойдет в разд. III, IV и V). Итак, при конкурентных исследованиях в качестве стандартной системы была использована наиболее простая и дающая минимальное неспецифическое связывание реконструированная система цитозоль — хроматин. Способность аналогов $1\alpha,25\text{-}(OH_2)\text{-}D_3$ вытеснять меченый гормон из комплексов с рецепторами хроматина определяли при инкубации $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}^3H\text{-}D_3$ (4 нМ) и немеченных стеринов со смесью цитозоля и хроматина. Во фракции хроматина измеряли количество связанного $1\alpha,\text{-}25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$. В качестве меры способности аналога взаимодействовать с системой гормональных рецепторов был использован процент подавления связывания $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}^3H\text{-}D_3$ хроматином в присутствии немеченного аналога. Результаты по определению относительного сродства изученных аналогов приведены в табл. 2.

Нерадиоактивный $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ обладал наибольшей среди других стеринов способностью вытеснять радиоактивный гормон из комплексов с рецепторами хроматина, причем при использовании препаратов $1\alpha\text{-}25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$, полученных ферментативным методом [30] и синтезированных химически (д-р М. Р. Ускокович, Hoffman-La Roche Inc.), в концентрации 4 нМ степень вытеснения была одинаковой (50%). Оценить относительную эффективность аналогов в этой системе можно, приняв эффективность $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ за 1,0. По снижению связывания $1\alpha,25\text{-}(OH)_2[^3H]\text{-}D_3$ рецепторами хроматина активность $25\text{-}OH\text{-}D_3$ и $1\alpha\text{-}OH\text{-}D_3$ составляет соответственно 1/500 и 1/800 активности природного гормона. Активность витамина $D_3$ и дигидротахистерина$_2$ при данном методе оценки составляет лишь 1/100 000 активности $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$. Таким образом, стерины ряда витамина D, имеющие лишь одну гидроксильную группу, подобно витамину $D_3$ или дигидротахистерину$_2$, обладают резко сниженной способностью взаимодействовать с рецепторами $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$. Данное наблюдение показывает также, что несущественно, где находится гидроксильная группа: при 3-м углеродном атоме (витамин $D_3$) или же в псевдо-$1\alpha$-положении[1] (дигидротахистерин$_2$). Стерины с двумя гидроксильными группами из трех, имеющихся в $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ (например, $25\text{-}OH\text{-}D_3$-$1\alpha\text{-}OH\text{-}D_3$), связываются с рецептором уже лучше, но все же на 2—3 порядка слабее, чем природный гормон. Таким образом, для достижения оптимального связывания молекулы стерина с рецепторами существенны и $1\alpha$-, и 25-гидроксильные функции. В табл. 2 показано также, что активность 5,6-*транс*-$25\text{-}OH\text{-}D_3$ составляет $^1/_{100}$ активности $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$. Поскольку этот аналог имеет гидроксильные группы и в псевдо-$1\alpha$-, и в 25-м положениях, но лишен

[1] Вращение кольца А на 180° при химическом синтезе дигидротахностеролов или *транс*-витаминов D позволяет считать, что положение гидроксильной группы при 3-м углеродном атоме аналогично ее $1\alpha$ стереохимической ориентации в $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$.

гидроксильной группы при С-3, ясно, что гидроксильная группа при С-3 имеет существенное значение для гормон-рецепторного взаимодействия. Однако в 5,6-*транс*-25-OH-$D_3$ метиленовая группа при С-19 повернута на 180° (рис. 5), поэтому возможно, что вращение кольца А в этом соединении создает общее изменение конформации молекулы, препятствующее ее взаимодействию с рецептором. Для однозначного ответа на вопрос о значении гидроксила при С-3 необходимо исследовать сродство рецепторов к соединениям типа 3-дезокси-1α,25-$(OH)_2$-$D_3$.

Окружение гидроксильной функции при 25-углеродном атоме оказывает заметное влияние на взаимодействие аналога с рецептором. Последовательное удаление концевых метильных групп приводит к постепенному снижению связывающего сродства. Так, 27-нор-5,6-*транс*-25-OH-$D_3$ конкурирует с меченым гормоном за рецепторные места в 6 раз слабее, чем 5,6-*транс*-25-OH-$D_3$ (табл. 2). Кроме того, 25-OH-$D_3$ оказался в 7 и 39 раз более эффективным при вытеснении 1α,25-$(OH)_2$-$^3H$-$D_3$ из хроматина, чем соответственно 24-нор-25-OH-$D_3$ и 26,27-*биснор*-25-OH-$D_3$. Таким образом, эксперименты по определению связывания аналогов, из боковой цепи молекул которых удалены метильные или метиленовые группы, показывают, что стереоспецифическое взаимодействие 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ с рецепторами ткани-мишени сильно зависит от гидроксильной группы при С-25 и ее окружения. Последнее было четко продемонстрировано путем изменения конфигурации гидрофобной боковой цепи.

Очень любопытны также данные, касающиеся 24,25-OH-$D_3$. Синтезированы были оба эпимерных по боковой цепи соединения, 24R,25-$(OH)_2$-$D_3$ и 24S,25-$(OH)_2$-$D_3$, но не известно, которое из них является природным метаболитом витамина D. 24R,25-$(OH)_2$-$D_3$, обладает $^1/_{800}$ активности гормона и по эффективности близок, таким образом, к 25-OH-$D_3$. В то же время 24S,25-$(OH)_2$-$D_3$ оказывается в 21 раз менее активным, чем 24R-эпимер (табл. 2). Такое значительное различие в способности 24R,25-$(OH)_2$-$D_3$ и 24S,25-$(OH)_2$-$D_3$ связываться рецепторами можно объяснить двояко:

1. Поскольку 24R,25-$(OH)_2$-$D_3$ на молекулярном уровне значительно активнее 24S-эпимера, похоже, что именно он является природным метаболитом витамина $D_3$. На этом основании можно было бы предположить, что 24R,25-$(OH)_2$-$D_3$ — биологически важный витамин D и, возможно, служит предшественником другой важной формы витамина — 1α,24R,25-$(OH)_2$-$D_3$ [31].

2. С другой стороны, если 24-гидроксилирование является одной из стадий инактивации витамина D, то природным метаболитом мог бы быть 24S,25-$(OH)_2$-$D_3$. Это означало бы, что 24S,25-$(OH)_2$-$D_3$ и, возможно, 1α,24S,25-$(OH)_2$-$D_3$ возникают в результате катаболизма 25-OH-$D_3$ как значительно менее активные соединения. Пока не удастся идентифицировать природный

24,25-$(OH)_2$-$D_3$ с одним из двух синтетических эпимеров, невозможно и решить, какая из двух указанных выше функций присуща данному стерину.

Результаты изучения специфичности рецепторной системы хроматина кишечника для $1\alpha$,25-$(OH)_2$-$D_3$ ясно показывают, что и для связывания рецепторами, и для биологической активности стерина очень существенно наличие в его молекуле двух или, возможно, трех гидроксильных групп, а также целостность гидрофобной боковой цепи [32, 33]. Для окончательного выяснения топографии рецептор-стеринового взаимодействия потребуется очистка и физический анализ рецепторного белка, а также изучение возникающих в нем конформационных изменений под действием различных стеринов ряда витамина D. В следующем разделе приведены результаты экспериментов по предварительному выявлению и характеристике данного белка.

## III. ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ СВЯЗЫВАЮЩИЙ КОМПОНЕНТ ДЛЯ $1\alpha$,25-ДИОКСИВИТАМИНА $D_3$

Данные экспериментов по изучению распределения гормона при его введении in vivo или при его инкубации с тканью in vitro при 25—37° С показывают, что основным местом связывания $1\alpha$,25-$(OH)_2$-$D_3$ в клетках кишечника является ядерный хроматин. При этом возникают три основных вопроса:

1. Имеется ли в клетке специфический компонент, доставляющий стерин к хроматину?

2. К какой фракции хроматина относится уже провзаимодействовавший с гормоном связывающий компонент?

3. Каковы взаимоотношения между предполагаемым транспортным компонентом и гормональным рецептором, ассоциированным с хроматином? Первый из этих вопросов мы рассмотрим в данном разделе.

### А. Распределение гормона, зависимое от температуры

Результаты, приведенные в табл. 3, показывают, что субклеточное распределение $1\alpha$,25-$(OH)_2$-$D_3$ in vitro зависит от температуры [34]. При инкубации кишечника с $1\alpha$,25-$(OH)_2$-$D_3$ при 0° С гормон, по данным, полученным субфракционированием клеток, остается связанным в цитозоле. Но если затем инкубацию продолжить при 37° С, то наблюдается явное перемещение гормона во фракцию хроматина.

Обнаруженные факты свидетельствуют о том, что первоначально гормон связывается в цитозольной фракции, а уже затем транспортируется в хроматин ядра. На существование цитозольных рецепторов указывают данные по инкубации при 0° С. Для того чтобы первоначальный гормон-рецепторный комплекс связал-

ся с хроматином, необходима, очевидно, зависимая от температуры стадия активации образовавшегося комплекса. Эксперименты с использованием реконструированных систем, содержащих цитозоль и ядра или цитозоль и хроматин, позволили нам установить, что присутствие цитозоля является обязательным условием связывания 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ хроматином кишечника [34, 35].

*Таблица 3*

**Зависимость внутриклеточного распределения 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ в кишечнике от температуры**

| Температура, °С | Субклеточная фракция | Доля от суммарного количества гормона, % |
|---|---|---|
| 0 | Цитозоль | 53 |
| | Хроматин | 17 |
| | Митохондрии | 23 |
| | Микросомы | 7 |
| 37 | Цитозоль | 9 |
| | Хроматин | 65 |
| | Митохондрии | 20 |
| | Микросомы | 6 |

**Б. Выделение и характеристика цитозольного рецептора гормона. Отличия от сывороточного связывающего белка и белка, связывающего 25-оксивитамин $D_3$**

Биохимические свойства макромолекул цитозоля, связывающих 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ и транспортирующих его к хроматину, были нами недавно исследованы. Инкубируя 1α,25-$(OH)_2$-$^3H$-$D_3$ с цитозолем кишечника при 0° С и анализируя инкубационную смесь методом центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы, мы обнаружили, что гормон избирательно связывается макромолекулами, имеющими коэффициент седиментации 3,7S (рис. 6). Эти цитозольные рецепторы к 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ по коэффициенту седиментации отличаются от сывороточного белка, связывающего 25-OH-$D_3$ и 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ (4,0S), а также от обнаруженного в некоторых тканях крыс [36] и цыплят [37] белка, связывающего лишь 25-OH-$D_3$ (5—6 S). Таким образом, в цитозоле кишечника имеются два явно различающихся компонента: один из них связывает исключительно 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$, а другой — преимущественно 25-OH-$D_3$. Данные, представленные на рис. 6, дают основание думать, что выявленные макромолекулы не являются результатом загрязнения цитозоля сывороточными белками. С помощью гель-хроматографии, использования нуклеаз и протеаз, применения для исследования фильтров [38] и некоторых других методов мы обнаружили ряд дополнительных свойств цитоплазматических ре-

цепторов 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$: а) их кажущийся молекулярный вес равен 47 000; б) рецепторы имеют белковую природу; в) они содержат один тип независимых друг от друга, насыщаемых участков с $K_d = 2 \cdot 10^{-9}$ M для гормона; г) рецепторы специфичны для 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ : 25-OH-$D_3$ конкурирует за связывающие участки

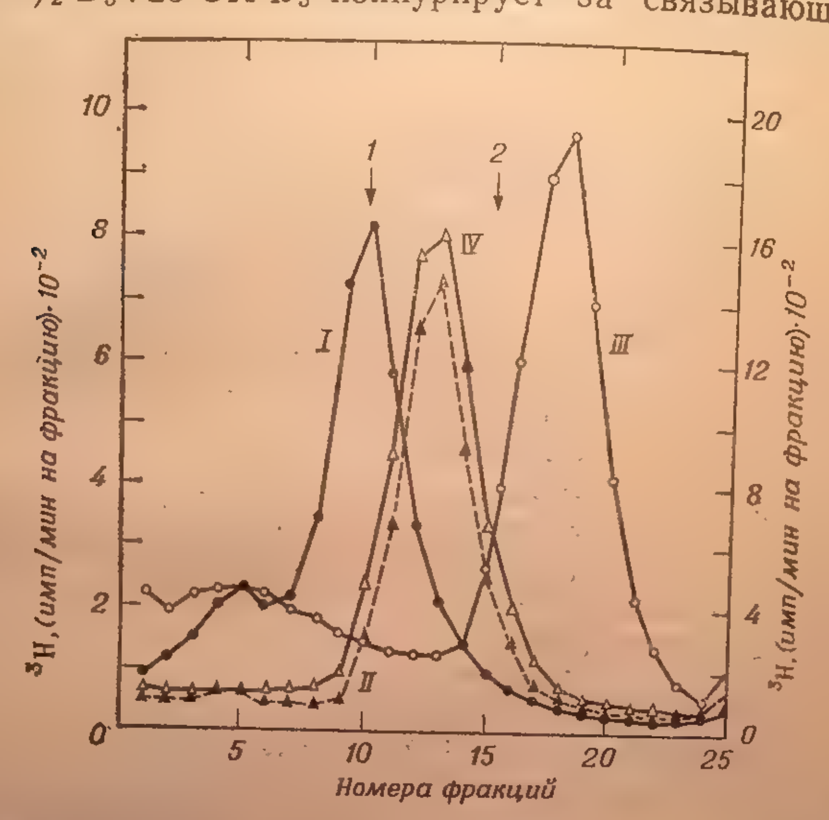



**Рис. 6.** Центрифугирование в градиенте концентрации сахарозы связывающих 1α, 25-$(OH)_2$-$D_3$ и 25-OH-$D_3$ компонентов сыворотки крови и цитозоля кишечника цыплят. 1α, 25-$(OH)_2$-$^3H$-$D_3$ (6 Ки/ммоль, $1{,}5 \cdot 10^{-8}$ M) инкубировали 30 мин при 0° С с цитозолем кишечника (*I*) или сывороткой (*II*) цыплят. Аналогичным образом с цитозолем кишечника (*III*) или сывороткой (*IV*) цыплят инкубировали 25-OH-$^3H$-$D_3$ (6 Ки/ммоль, $1{,}5 \cdot 10^{-8}$ M). Затем пробы центрифугировали в 5—20%-ных градиентах концентрации сахарозы в присутствии 0,3 M KCl в течение 20 ч при 234 000 g. Стрелками показано седиментационное положение внешних белковых стандартов: *1* — овальбумин (3,67 S); *2* — бычий сывороточный альбумин (4,4 S) [37] (с разрешения издательства Pergamon Press).

в 200—500 раз слабее гормона; д) рецепторные белки выявляются в кишечнике, но не в органах-немишенях, например в печени. Эти свойства 3,7S-компонента цитозоля кишечника показывают, что данный белок с высоким сродством к 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ выполняет функцию рецептора гормона, связывая этот стерин в клетках-мишенях и транспортируя его в клеточное ядро.

## IV. ЯДЕРНЫЙ СВЯЗЫВАЮЩИЙ КОМПОНЕНТ ДЛЯ 1α, 25-ДИОКСИВИТАМИНА $D_3$

Для выяснения взаимосвязи ядерных и цитоплазматических рецепторов 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ было предпринято изучение природы ре-

цепторов гормона, ассоциированных с хроматином. После введения 1α,25-$(OH)_2$-$^3$H-$D_3$ (50 пмоль) цыплятам, лишенным витамина D, в ядрах клеток кишечника наблюдалось связывание этого

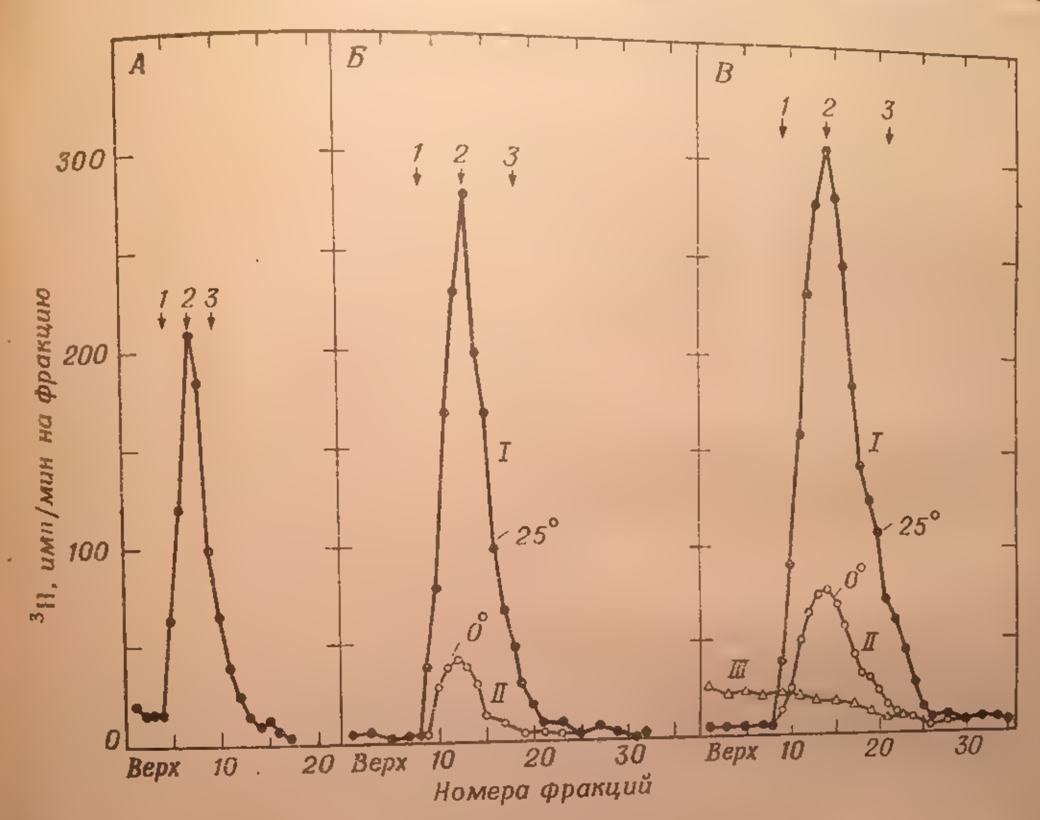



Рис. 7. Выявление ядерных связывающих 1α, 25-$(OH)_2$-$D_3$ компонентов центрифугированием в градиенте концентрации сахарозы. *А*. Цыплят забивали через 30 мин после перорального введения 50 пмоль 1α, 25-$(OH)_2$-$^3$H-$D_3$. *Б*. Гомогенат слизистой кишечника (3 мл) инкубировали с 1α, 25-$(OH)_2$-$^3$H-$D_3$ (8 нМ) в течение 20 мин при 25 (*I*) или при 0° С (*II*). *В*. Выделенные из слизистой кишечника хроматин и цитозоль объединяли, смесь (2 мл) инкубировали в течение 10 мин с 1α, 25-$(OH)_2$-$^3$H-$D_3$ (4 нМ) при 25 (*I*) или при 0° С (*II*). В одну из инкубировавшихся при 25° С проб добавляли 800 нМ немеченого 1α, 25-$(OH)_2$-$D_3$ (*III*). После инкубации выделяли хроматин и экстрагировали его 0,3 М KCl. Аликвоты экстрактов (0,3 мл) центрифугировали в 5—20%-ных градиентах сахарозы, содержавших 0,3 М KCl, как указано в подписи к рис. 6. Стрелками показано положение внешних белковых стандартов: *1* — химотрипсиноген; *2* — овальбумин; *3* — бычий сывороточный альбумин [39] (с разрешения Американского общества биохимиков).

стерина макромолекулами. Эти макромолекулы экстрагировали 0,3 М KCl-трис-ЭДТА буфером, что позволяет отделить некоторые негистоновые белки от дезоксирибонуклеопротеидов. Ядерный экстракт фракционировали центрифугированием в 5—20%-ном градиенте концентрации сахарозы, содержавшем 0,3 М KCl. Связывающие 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ молекулы обладали при этом коэффициентом седиментации около 4S (рис. 7, *А*).

Взаимодействие гормона с ядерными связывающими компонентами наблюдалось и in vitro. Гомогенаты слизистой кишечника инкубировали с $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}^3H\text{-}D_3$ (8 нМ) при 25° С в течение 20 мин. Фракцию хроматина выделяли при 0° С и экстрагировали 0,3 М KCl. При анализе ядерного экстракта центрифугированием в градиенте концентрации сахарозы обнаружено наличие 3,7S-пика связанного $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ (рис. 7, *Б*). Следовательно, ядерные рецепторы седиментируют точно так же, как и 3,7S-рецепторы цитозоля. Если же гомогенаты инкубировали в течение 20 мин при 0° С, то с ядерными 3,7S-макромолекулами связывалось значительно меньше стерина. В этой главе уже говорилось о температурной зависимости связывания гормона хроматином; та же зависимость наблюдается и в случае, когда рецепторы хроматина солюбилизируют 0,3 М KCl и анализируют методом центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы. Сходные результаты были получены при использовании реконструированной двухкомпонентной рецепторной системы для $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$; эту систему (цитозоль+хроматин) инкубировали с меченым гормоном (4 нМ) в течение 10 мин при 25 или 0° С, а затем ядерные рецепторы экстрагировали 0,3 М KCl (рис. 7, *В*).

Поскольку центрифугированием в градиенте концентрации сахарозы не удавалось отличить цитоплазматические рецепторы $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ от ядерных (рецепторы обоих типов имеют коэффициент седиментации 3,7S), можно было предположить, что ядерный компонент появляется за счет перемещения в ядро комплекса стерина с цитоплазматическим компонентом. Главным доводом в пользу этого предположения послужил тот факт, что для ассоциации меченого гормона с хроматином в реконструированной системе цитозоль — ядра необходимым условием является присутствие цитозоля слизистой кишечника [34, 35]. Для последующего изучения возможной связи между ядерными и цитоплазматическими рецепторами $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ меченый гормон инкубировали с реконструированной системой цитозоль — хроматин. После предварительной инкубации с $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}^3H\text{-}D_3$ при 0° С в течение 5 мин инкубацию продолжали уже при 25° С в течение различных интервалов времени. Затем цитоплазматические и ядерные связывающие компоненты выявляли центрифугированием в градиенте концентрации сахарозы (рис. 8). В период, предшествовавший инкубации при 25° С меченый стерин образовывал комплекс с цитоплазматическими рецепторами, а в ядре количество гормон-рецепторных комплексов было невелико. Прогревание рецепторных компонентов при 25° С приводит к резкому повышению количества $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$, связанного ядерными рецепторами, и одновременному снижению содержания гормона, связанного цитоплазматическими рецепторами. Исчезновение цитоплазматических комплексов нельзя объяснить разрушением рецепторов при повышенной температуре инкубации, поскольку известно, что концентрация цито-

плазматических рецепторных компонентов не снижается существенно за 5 мин при 25° С [39]. Эти результаты дают основание думать, что хроматин слизистой кишечника еще до воздействия гормоном может содержать небольшие количества рецепторов 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$. В то же время рецепторы, обнаруживаемые в ядре после воздействия гормоном, являются результатом транслокации в ядро цитоплазматических комплексов 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ с рецептором.

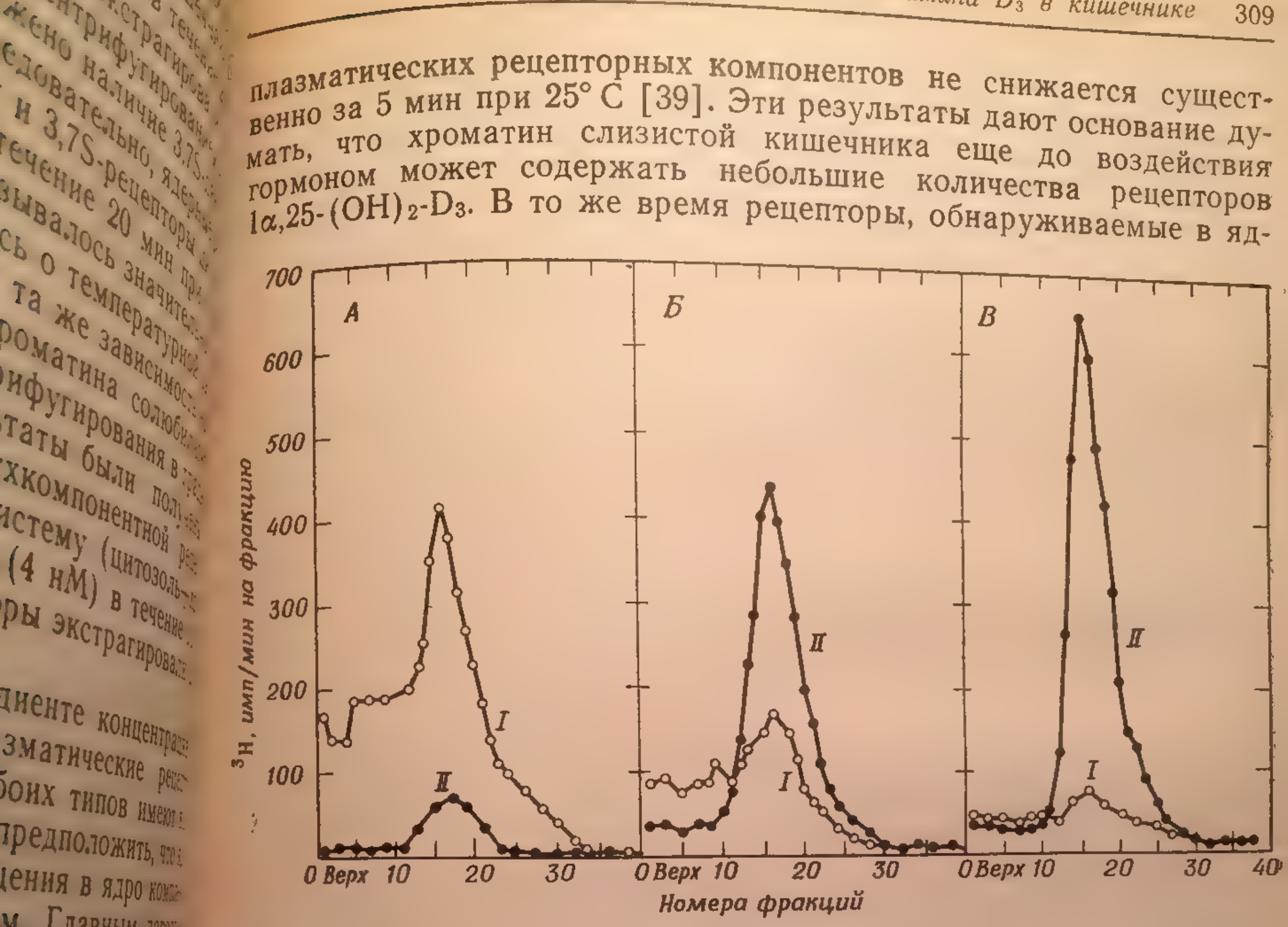



Рис. 8. Переход 1α, 25-$(OH)_2$-$D_3$-рецепторных комплексов из цитоплазмы кишечника в хроматин при 25° С in vitro. После предварительной инкубации смеси цитозоля и хроматина (1 мл) с 1α, 25-$(OH)_2$-$^3H$-$D_3$ (6 нМ) в течение 5 мин при 0° С инкубацию продолжали при 25° С в течение 0 мин (*А*), 2 мин (*Б*) и 5 мин (*В*). Затем для разделения цитозоля (надосадочная фракция) и хроматина (осадок) пробы центрифугировали 20 мин при 30 000 g. Хроматин экстрагировали 0,3 М KCl. Аликвоты (0,3 мл) цитозоля (*I*) и экстрактов хроматина (*II*) центрифугировали в 5—20%-ных градиентах сахарозы в течение 20 ч при 0° С, как указано в подписи к рис. 6 [39] (с разрешения Американского общества биохимиков).

## V. СРАВНЕНИЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО И ЯДЕРНОГО СВЯЗЫВАЮЩИХ КОМПОНЕНТОВ

Поскольку скорости седиментации ядерного и цитоплазматического компонентов были одинаковы (3,7S) и тщательно сопоставлялись со скоростью седиментации овальбумина, использовавшегося в качестве внутреннего стандарта в каждой пробе, важно было подтвердить сходство этих рецепторных макромолекул

независимым методом. Комплексы $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ с макромолекулярными компонентами цитозоля и ядерных экстрактов достаточно прочны, чтобы выдержать фракционирование на колонках агарозного геля. Для дальнейшего сопоставления цитоплазматического и ядерного $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$-связывающих белков была использована

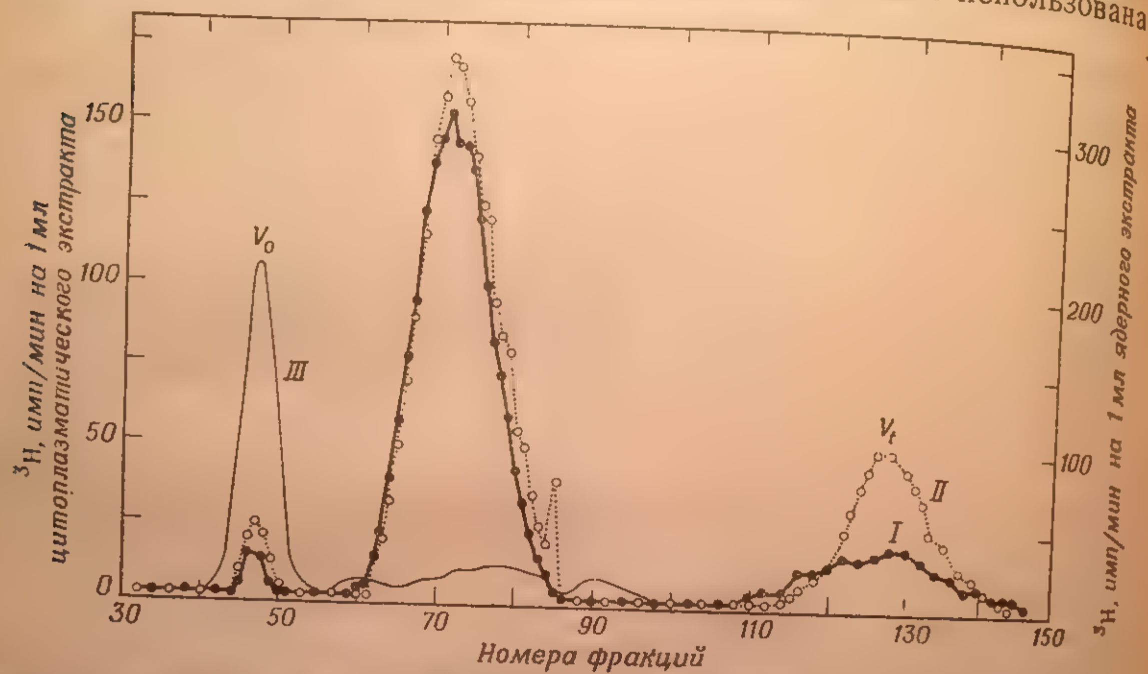



**Рис. 9.** Гель-фильтрация на агарозе цитоплазматических и ядерных связывающих $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ компонентов кишечника цыплят. Цитозоль и хроматин кишечника объединяли (2 мл) и инкубировали с $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}^3H\text{-}D_3$ (4 нМ) 10 мин при 25° С. Затем хроматин экстрагировали 0,3 М KCl. Цитозоль слизистой кишечника (полученный в 0,3 М KCl) инкубировали с $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}^3H\text{-}D_3$ (6 нМ) 30 мин при 0° С. Экстракт хроматина (*I*) или цитозоль (*II*) в объеме 0,5 мл наносили на колонку агарозы А — 0,5М (1,6×65 см) и элюировали 0,3 М KCl при 0° С. Собирали фракции по 1 мл; в элюате цитозоля определяли относительную оптическую плотность при 280 нМ (*III*). Первый элюируемый с колонки пик радиоактивности представляет собой материал, исключаемый с геля, поскольку он элюируется в том же объеме, что и голубой декстран. Кажущийся молекулярный вес главного компонента, связывающего $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ (по данным зависимости $^1/_2$ молекулярного веса от $K_D^{1/3}$ для глобулярных белков-стандартов), равен 47 000. Третий пик радиоактивности соответствует положению элюции свободного $^3$H-стерина [39] (с разрешения Американского общества биохимиков).

гель-фильтрация на колонках агарозы в 0,3 М KCl (рис. 9). Связывающая $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}^3H\text{-}D_3$ активность и цитозоля и ядер элюируется в виде трех пиков. Главный пик представляет собой $^3$H-стерин, связанный белком с кажущимся мол. весом 47 000. Этот белок отделяется от основной массы суммарного белка, элюируемого в исключаемом объеме колонки. Никакой разницы в поведении ядерного и цитоплазматического компонентов при гель-фильтрации в одинаковых, стандартизированных условиях обнаружить не удалось. Оба пика компонентов $^3$H-гормона с макромолекулами исчезали, если во время инкубации к пробам добавляли избыток неме-

ченого 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$. Таким образом, с помощью методов ультрацентрифугирования и гель-хроматографии не удалось обнаружить различий между специфическими ядерными и цитоплазматическими рецепторами 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$. Полученные данные подтверждают, что ядерные и цитоплазматические рецепторы представляют собой сходные макромолекулы, неразличимые использованными методами центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы и гель-фильтрации на агарозе. Но, с другой стороны, поскольку для связывания с хроматином гормон-рецепторных комплексов цитозоля необходима стадия их температурной активации, в структуре цитоплазматических и ядерных рецепторов имеется, вероятно, очень важное различие. В случае эстрогенных рецепторов матки подобное различие проявляется в изменении коэффициента седиментации с 4 до 5S [12], что, возможно, обусловлено присоединением специфической пептидной субъединицы [40]. В то же время превращение рецепторов прогестерона из цитоплазматической формы в ядерную не сопровождается заметными изменениями таких физических свойств, как коэффициент седиментации или молекулярный вес, определяемый методом гель-фильтрации [13]. Итак, рецепторная система для 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ кишечника больше напоминает систему для прогестерона, чем для эстрогенов; вместе с тем все три системы обладают важным общим свойством — перенос гормона в ядро зависит от температуры.

## VI. НАЛИЧИЕ В ТКАНЯХ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ И ЯДЕРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Для проверки тканевой специфичности эффекта транслокации цитоплазматических рецепторов в ядро были проведены эксперименты с использованием цитозоля и хроматина тканей-немишеней. Цитозольные фракции печени, почек и кишечника цыплят объединяли с хроматином кишечника и инкубировали с 1α,25-$(OH)_2$-$^3H$-$D_3$. После этого хроматин экстрагировали 0,3 M KCl и ядерные комплексы анализировали центрифугированием в градиенте концентрации сахарозы (рис. 10). Наиболее эффективным в переносе гормон-рецепторных комплексов в ядра кишечника оказался цитозоль кишечника. Но в случае использования цитозолей органов-немишеней из хроматина удавалось проэкстрагировать достаточно много ядерных рецепторных комплексов. Эти данные оказались весьма неожиданными, поскольку 3,7S-цитоплазматические рецепторы в почках и печени обнаружить не удавалось [41], а с другой стороны, более ранние исследования (см. рис. 8 и [35]) свидетельствовали о том, что единственным источником ядерных рецепторов 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ является цитозоль. Этот факт можно было бы объяснить тем, что 3,7S-рецепторы присутствуют (в небольших количества) в хроматине слизистой кишечника еще до воздействия 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ и выявляются после объединения хроматина с цитозолем тканей-не-

мишеней. Доводом в пользу такого предположения может служить отсутствие 3,7S-компонентов в экстрактах хроматина печени или почек после их объединения с одноименным цитозолем (рис. 10), а также то, что 3,7S-компонент можно обнаружить в хроматине, выделенном из кишечника, но не из печени или почек (рис. 11).

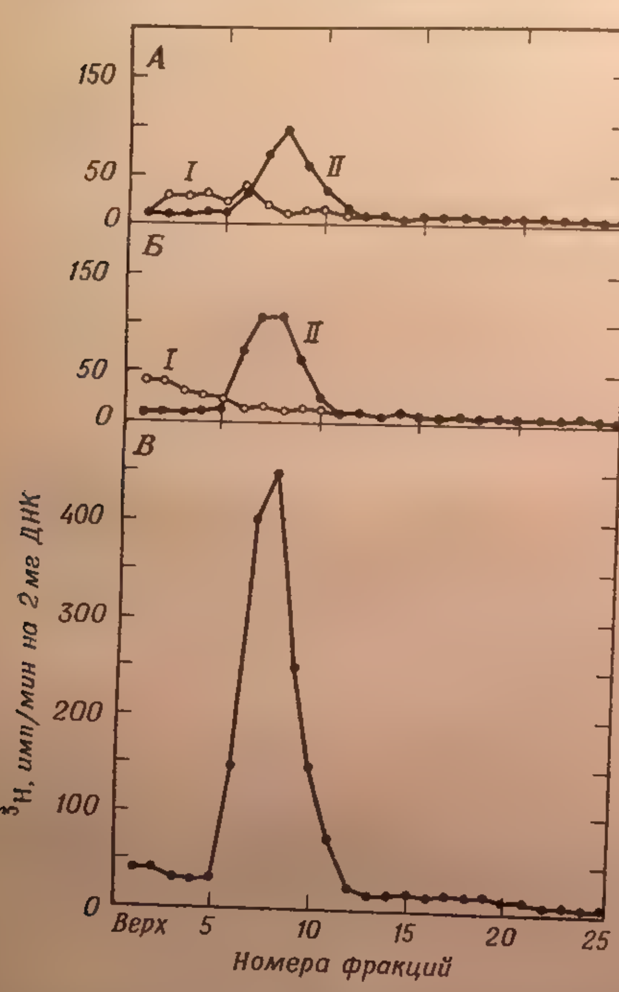



**Рис. 10.** Переход $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}^3H\text{-}D_3$ из цитозоля печени, почек и кишечника в хроматин кишечника in vitro. $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}^3H\text{-}D_3$ (6,0 Ки/ммоль, 2 нМ) инкубировали с 2 мл следующих смесей: *А* — цитозоль печени с хроматином печени (*I*) или с хроматином кишечника (*II*); *Б* — цитозоль почек с хроматином почек (*I*) или с хроматином кишечника (*II*); *В* — цитозоль кишечника с хроматином кишечника. Экстракты хроматина (0,3 М KCl) центрифугировали в 5—20%-ном градиентах сахарозы, как указано в подписи к рис. 6. Все инкубационные смеси содержали 2—3 мг ДНК; количество радиоактивности, собранной с градиентов, пересчитывали на 2 мг ДНК [39] (с разрешения Американского общества биохимиков).

Для изучения вопроса о специфичности хроматина слизистой кишечника в связывании цитоплазматических комплексов $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ с рецепторами была проведена специальная серия экспериментов. Цитозоль слизистой кишечника объединяли с хроматином печени, почек и кишечника цыплят и инкубировали с $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}^3H\text{-}D_3$. Как показано на рис. 11, хроматин слизистой кишечника захватывает больше цитоплазматических рецепторов кишечника, чем хроматин печени и почек. Если в инкубационную смесь добавлять 200-кратный избыток $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$, то при центрифугировании в градиенте концентрации сахарозы макромолекулярное связывание гормона не выявляется (рис. 11). Таким образом, в результате инкубации меченого гормона с хроматином тканей-немишеней в присутствии цитозоля кишечника $^3H$-стерин связывался специфически 3,7S-рецепторным компонентом ядер.

В дополнительных экспериментах хроматин смешивали не с цитозолем, а с буфером и инкубировали с 1α,25-$(OH)_2$-$^3H$-$D_3$. После такой обработки 3,7S-рецепторный пик в хроматине тканей-немишеней обнаружить не удавалось. Следовательно, источником гормон-рецепторных комплексов, захватываемых хроматином почек и пе-

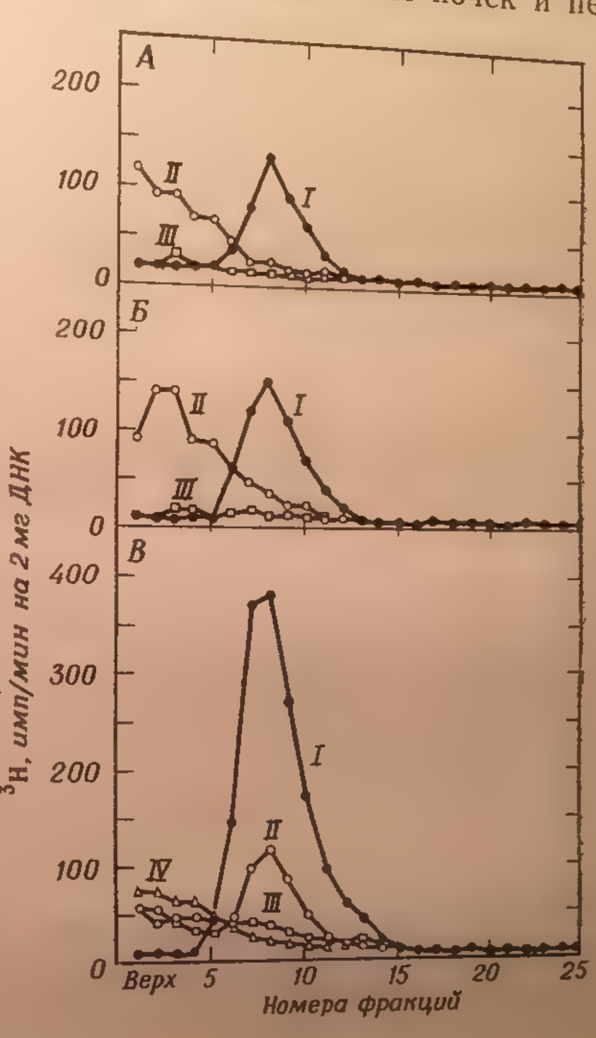



**Рис. 11.** Переход 1α,25-$(OH)_2$-$^3H$-$D_3$ из цитозоля кишечника в хроматин печени, почек или кишечника in vitro. 1α,25-$(OH)_2$-$^3H$-$D_3$ (6,0 Ки/ммоль, 2 нМ) инкубировали с 2 мл следующих смесей: *А* — хроматин печени с цитозолем кишечника (*I*) или с буфером (*II*); *Б* — хроматин почек с цитозолем кишечника (*I*) или с буфером (*II*); *В* — цитозоль кишечника с хроматином кишечника (*I*) или с буфером (*II*). В параллельных экспериментах к пробам, содержавшим цитозоль кишечника и хроматин органов-немишеней (*А, Б, В — III*) или хроматин кишечника и буфер (*В—IV*) добавляли 200-кратный избыток немеченого 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$. Экстракты хроматина центрифугировали в 5—20%-ном градиентах сахарозы, как указано в подписи к рис. 6. Все пробы содержали 2—3 мг ДНК; количество радиоактивности, собранной с градиентов, пересчитывали на 2 мг ДНК [39] (с разрешения Американского общества биохимиков).

чени, является, очевидно, цитозоль кишечника. Эффективность хроматина печени и почек в связывании цитоплазматических рецепторов составляет соответственно 36 и 27% эффективности хроматина кишечника. Таким образом, представленные на рис. 10 и 11 данные свидетельствуют о том, что во взаимодействии 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ с тканью-мишенью имеется два «уровня» специфичности: для максимального захвата гормон-рецепторных комплексов хроматином необходимы одновременно и цитозоль, и хроматин кишечника.

## VII. МОДЕЛЬ РАННИХ СОБЫТИЙ В ДЕЙСТВИИ 1α,25-ДИОКСИВИТАМИНА $D_3$

Результаты, суммированные в этом разделе и более детально изложенные в оригинальных работах [28, 32, 34, 35, 37, 39], согласуются с представленной на рис. 12 моделью ранних событий при взаимодействии 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ с его органом-мишенью. 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ входит в клетку слизистой кишечника и связывается цитоплазматическими рецепторами. После этого гормон в виде гормон-рецепторного комплекса транспортируется в хроматин. Для осуществления этого транспорта необходим этап зависимой от температуры активации (или трансформации) комплекса, приводящий к появлению у рецепторов способности прочно связываться с интерфазными хромосомами (хроматином). Взаимодействие гормон-рецепторных комплексов со специфическими местами хроматина (акцепторами) обеспечивает, вероятно, усиление транскрипции отдельных областей генома. Предполагается, что при этом открываются специфические гены и одновременно повышается активность РНК-полимеразы II [16], что приводит к синтезу новой РНК. По всей вероятности, эта РНК представляет собой мРНК или ее предполагаемый предшественник [42] — гетерогенную ядерную РНК. По-видимому, эта РНК после процессинга и перемещения в цитозоль, транслируется в белки, участвующие в транспорте кальция, такие, как кальций-связующий белок (CaСБ).

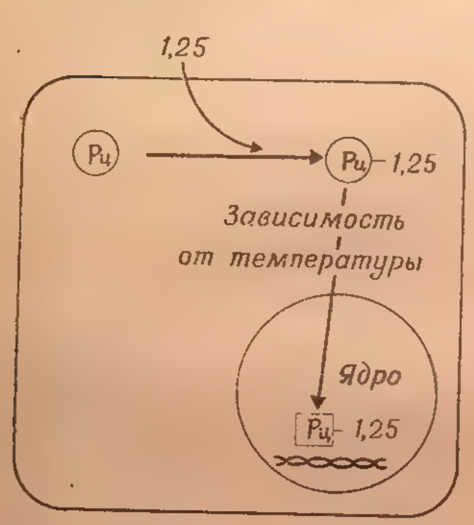



**Рис. 12.** Модель взаимодействия 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ с клеткой кишечника. Буквами Рц, взятыми в кружок, обозначен рецепторный белок цитозоля; буквами Рц в квадрате — рецепторный белок ядра.

Для проверки гипотетической модели действия 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$, показанной на рис. 12, потребуется большая экспериментальная работа. Прежде всего необходимо получить цитозольные рецепторы 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ в чистом виде. Это требуется не только для выяснения параметров связывания стериновых лигандов и создания оптимальных аналогов стерина и антивитаминов, но и для выяснения природы трансформации гормон-рецепторных комплексов и их взаимодействия с хроматином ядра. Недавно рецепторы эстрогенов [43] и прогестерона [44] ткани матки были очищены с помощью аффинной хроматографии. Данный метод, очевидно, достаточно эффективен для выделения белков, концентрация которых низка (<0,01% суммарного белка). Следует также выяснить, являются ли специфические акцепторные молекулы генома ткани-мишени негистоновыми хромосомными белками, которые, как пола-

гают, регулируют работу генов в клетках эукариотов [45, 46]). Хотя нам удалось наблюдать связывание гормон-рецепторных комплексов с хроматином ткани-мишени in vitro, чтобы доказать участие этого связывания в действии гормона in vivo, потребуется создание реконструированной системы, содержащей РНК-полимеразу, предшественники РНК, гормон-рецепторные комплексы и хроматин, которая обеспечивала бы синтез de novo мРНК, кодирующей транспортирующие кальций белки. Конечно, надо прежде всего выделить эту РНК и доказать, что она специфически транслируется в конечный белок типа СаСБ. Иными словами, необходимо выполнить работу, аналогичную проделанной О'Мелли и Минсом [13] по индукции мРНК овальбумина в яйцеводах цыплят. После этого, возможно, удастся с помощью РНК-зависимой ДНК-полимеразы синтезировать комплементарную ДНК, которую можно было бы использовать для создания метода измерения индуцируемой мРНК. Наличие метода определения мРНК для СаСБ было бы очень ценным. С помощью такого метода можно было бы, во-первых, показать, что концентрация этой мРНК повышается при гормональном воздействии in vivo. Во-вторых, можно было бы доказать, что гормон-рецепторные комплексы действительно вызывают избирательный синтез мРНК для СаСБ в реконструированной системе рецепторы — хроматин in vitro.

Если 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$-рецепторные комплексы в самом деле стимулируют образование отдельных новых типов мРНК, то это действие могло бы обеспечиваться несколькими вероятными механизмами. а) Транскрипция генов и синтез РНК могут быть увеличены в силу изменений матричной активности хроматина. Это могло бы происходить за счет взаимодействия рецепторов с гистонами, приводящего к раскрытию специфических генов, или же, что более вероятно, за счет влияния на негистоновые белки, способные контролировать транскрипцию генов [46]. Заманчиво предположить, что рецепторы либо сами обладают протеинкиназной активностью [47], либо активируют эндогенную внутриядерную протеинкиназу, фосфорилирующую хромосомные белки, что в конечном счете влияет на транскрипцию. Таким образом, гормон-рецепторные комплексы могут дестабилизировать геном либо непосредственно [48], либо действовать через ферменты, модифицирующие хромосомы. б) Гормон-рецепторные комплексы могли бы активировать собственно РНК-полимеразный комплекс. Рецептор может служить модулирующей субъединицей РНК-полимеразы или же влиять на формирование комплекса инициации фермента с ДНК за счет одновременного связывания и с РНК-полимеразой, и с ДНК. Возможно также, что рецептор способствует ферментативной модификации полимеразы (например, за счет фосфорилирования) или же индуцирует новые молекулы полимеразы, оказывая влияние на хроматиновую матрицу. в) Возможно, что рецепторы 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ регулируют внутриядерный процессинг и (или) транспорт РНК из

ядра в цитоплазму [42] или же влияют на катаболизм РНК. Вопрос о механизмах регуляции активности генов и процессов развития является одной из важнейших нерешенных проблем биологии. Можно надеяться, что дальнейшее изучение механизма действия гормонов типа $1\alpha$,25-$(OH)_2$-$D_3$ на ядро облегчит изучение этой сложной фундаментальной проблемы.

## VIII. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДАННОЙ РЕЦЕПТОРНОЙ СИСТЕМЫ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Несмотря на то, что за счет введения витамина $D_2$[1] в молоко алиментарный рахит в США в основном побежден, существует ряд заболеваний костей (например, почечная остеодистрофия, зависимый от витамина D рахит, наследственный гипофосфатемический рахит и др.), напоминающих по своим свойствам резистентные к витамину D формы рахита. Имеется множество других заболеваний, связанных с нарушениями кальциевого обмена (например, идиопатическая гиперкальциурия, саркоидоз, первичный гиперпаратироидизм и т. д.), которые, по-видимому, характеризуются гиперактивностью витамина D. Кроме того, витамин D принадлежит к тем немногим витаминам, которые в сверхфизиологических дозах оказывают токсическое действие, что является причиной весьма многочисленных случаев гипервитаминоза D. Этиология токсичности витамина D в настоящее время выяснена совершенно недостаточно. Хотя многие из упомянутых заболеваний костей и кальциевого обмена обусловлены, вероятно, нарушениями превращения витамина $D_3$ в $1\alpha$,25-$(OH)_2$-$D_3$ или нарушениями регуляции этого превращения, причиной некоторых заболеваний могут оказаться поломки в системе рецепции $1\alpha$,25-$(OH)_2$-$D_3$ органами-мишенями. Для выяснения патофизиологических основ таких болезней надо располагать методическим арсеналом, позволяющим измерять метаболиты витамина D и проверять целостность и активность рецепторов органов-мишеней. Хотя рецепторы $1\alpha$,25-$(OH)_2$-$D_3$ у человека пока еще не исследовались, результаты изучения рецепторов этого стерина в кишечнике цыплят привели к определенным успехам в области биохимии витамина D, поскольку сделали возможным появление следующих методов. а) Создание на основе меченных радиоактивным изотопом рецепторов метода, дающего возможность точно измерять $1\alpha$,25-$(OH)_2$-$D_3$ в плазме человека. б) Разработка метода выявления и изучения соединений с активностью витамина D на основе анализа межмолекулярных взаимодействий. Этот подход не только позволяет установить, какие функциональные группы молекулы стерина усиливают его вита-

---

[1] Витамин $D_2$ является синтетическим витамином D, который получают облучением эргостерина. Его активность у человека равна активности витамина $D_3$. Витамин $D_2$ метаболизируется, видимо, до 25-OH-$D_2$ и $1\alpha$, 25-$(OH)_2$-$D_2$.

минную активность (см. разд. II, Г), но и дает возможность синтезировать такие стерины, которые можно было бы использовать при лечении больных. Кроме того, такой подход позволяет подойти к выяснению причины гипервитаминоза D.

### А. Определение 1α,25-диоксивитамина $D_3$ радиорецепторным методом

Выявление компонентов, специфически связывающих 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$, сделало возможным создание метода определения гормона на основе конкуренции лигандов за связывающие места рецепторов. С момента выяснения пути метаболической активации витамина D в его гормональную форму разработка методов определения активных метаболитов витамина D стала очень актуальной. Подобные методы могли бы найти применение и при изучении метаболизма витамина $D_3$ до 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$, и для выявления больных с отклонениями в минеральном гомеостазе, обусловленными нарушениями в метаболизме витамина D. На основе белков с высоким связывающим сродством к 25-OH-$D_3$ был создан метод определения этого стеринового предшественника [49, 50]. Концентрация 25-OH-$D_3$ в плазме человека, определенная этим методом, равна 20—30 нг/мл. По ряду технических причин разработка метода определения 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ — задача более сложная. Предполагали, что содержание этого стерина в крови должно быть значительно ниже содержания его менее активного предшественника, что делало необходимым применение белка с высоким сродством и специфичностью к данному гормону. Кроме того, удельная радиоактивность коммерческих препаратов 1α,25-$(OH)_2$-$^3H$-$D_3$ ниже удельной радиоактивности большинства стероидных гормонов, поэтому конкурентный анализ связывания 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ должен был бы быть относительно менее чувствительным.

В методе измерения 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$, подробно описанном в двух сравнительно новых публикациях [51, 52], эти технические проблемы были преодолены. Выделение и характеристика цитоплазматических и ядерных рецепторов 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ дали возможность использовать их для определения гормона. За счет своей высокой специфичности и сродства к 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ эти белки идеально приспособлены для такой цели. Для измерения стероидных гормонов были использованы соответствующие цитоплазматические рецепторы [53]. В настоящей же работе для анализа связывающей гормон активности были использованы и взаимодействие 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ с цитоплазматическими рецепторами, и способность последних специфически связываться с хроматином слизистой кишечника. Таким образом, при создании радиорецепторного метода определения гормона был целиком использован двухступенчатый механизм взаимодействия гормона с клеткой. Рис. 13 дает графическое представление о последовательности процедур при

радиорецепторном определении $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$. С помощью этого метода Брумбо и др. [52] установили, что содержание $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ в человеческой плазме составляет величину 30—40 пг/мл. Для сравнения приведем концентрации этого гормона у животных: крыса 160—200 пг/мл; цыпленок 40—80 пг/мл; собака 26—40 пг/мл; свинья 100—140 пг/мл; корова 50—70 пг/мл [54]. Таким образом, у изученных видов концентрация гормона в крови находится в пределах 30—200 пг/мл, или около $1 \cdot 10^{-10}$—$5 \cdot 10^{-10}$ М. Этот уровень совместим с функционированием рецептора с константой диссоциации примерно $10^{-9}$ М;

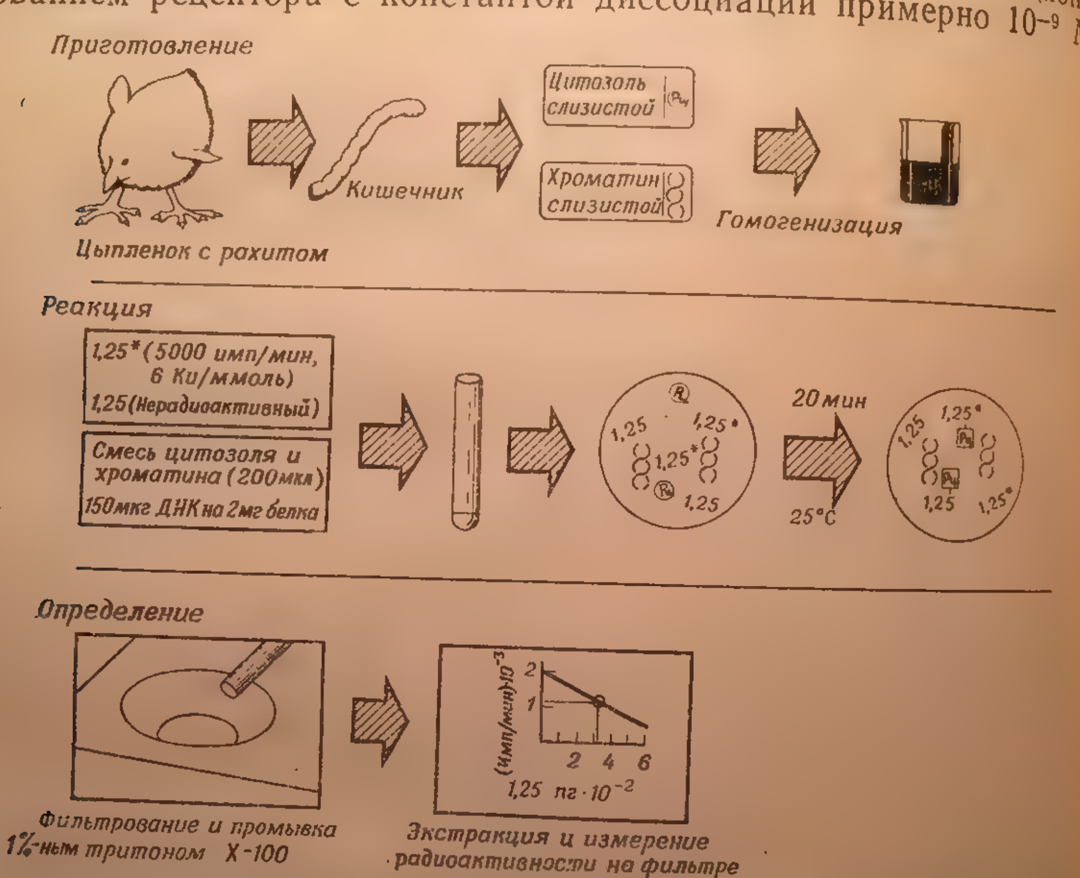



**Рис. 13.** Радиорецепторный метод определения $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ [52]. Сначала готовится смесь цитозоля с хроматином из тонкого кишечника цыплят с рахитом. Эту смесь инкубируют с насыщающим количеством $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}^3H\text{-}D_3$ (4 нМ, 5000 имп/мин) в присутствии различных количеств одноименного немеченого гормона или материала из образцов плазмы, в которых следует измерить гормон. В кружках показана конкуренция за ограниченное количество рецепторов в случае равных концентраций радиоактивного (*) и нерадиоактивного $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$. После инкубации при 25° С в течение 20 мин несвязавшийся гормон с помощью фильтрации отмывают от суперкомплекса гормон — рецептор — хроматин. В воображаемом случае, который изображен на рисунке, будет наблюдаться 50%-ная конкуренция; по стандартной кривой определим количество нерадиоактивного $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$, равное 320 пг. В действительности данный метод достаточно чувствителен для определения 20 пг гормона. При постоянном проведении анализов можно делать три параллельных определения для одного образца (объемом 20 мл) плазмы человека. Для удаления $25\text{-}OH\text{-}D_3$ и неспецифических липидов, которые мешают при данном радиорецепторном анализе, необходимо очищать $1\alpha,25\text{-}(OH)_2\text{-}D_3$ плазмы на 3—4 колонках.

именно такой величиной, как было показано, характеризуется взаимодействие 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ с рецепторами цитозоля кишечника цыплят [41]. Пожалуй, наиболее важный результат разработки радиорецепторного метода определения 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ — это возможность его применения в качестве диагностического инструмента для обнаружения заболеваний, при которых содержание данного гормона в крови отличается от нормального. Как и предполагали, у больных с хроническим заболеванием почек концентрация в крови продуцируемого почками гормона резко снижена, а у пациентов, лишенных почек, гормон вообще не удается определить [52]. Для случаев остеомаляции и зависимого от витамина D рахита также характерно низкое, не поддающееся определению содержание 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ в крови [55]. Однако у больных гипофосфатемическим, зависимым от витамина D рахитом содержание гормона находится в пределах нормы или слегка повышено [55]. Гипопаратироидизм и псевдогипопаратироидизм сопровождаются пониженным содержанием 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ в крови, а при первичном гиперпаратироидизме содержание этого стерина повышено [51, 55]. Таким образом, паратгормон может служить важным регулятором синтеза и секреции 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ у человека. У больных раком с гиперкальциемией невыясненной этиологии содержание 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ понижено или в норме [55]. Основываясь на этих данных, мы заключили, что отклонения содержания 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ в крови от нормы, возможно, играют важную роль в этиологии гиперкальциемических заболеваний, таких, как почечная остеодистрофия, остеомаляция и гипопаратироидизм, и заболеваний, сопровождающихся гиперкальциемией, например гиперпаратироидизма. В то же время в патогенезе резистентного к витамину D рахита или неопластической гиперкальциемии этот стерин не играет решающей роли. Можно ожидать, что последующие работы по измерению содержания 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ у больных с различными метаболическими заболеваниями костей и с другими близкими к ним расстройствами, для которых характерны нарушения метаболизма витамина D, приведут к распространению данного радиорецепторного метода и на другие важные области клинической практики. Кроме того, изучение рецепторов 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ у пациентов с резистентной к витамину D формой рахита должно помочь выяснить, имеются ли при этом заболевании нарушения со стороны связывающих компонентов клетки.

### Б. Клинические корреляции, основанные на результатах измерения рецепторов

Анализ конкурентного связывания 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ был использован также для оценки витаминной активности различных соединений на молекулярном уровне. Так, исходя из допущения, что эффективность аналогов как конкурентов природного гормона в си-

стеме рецептор — радиоактивный лиганд отражает биологическую активность изучаемого аналога, можно получать важные сведения о новых синтетических стеринах. Значительный интерес представляет $1\alpha$-оксивитамин $D_3$ ($1\alpha$-OH-$D_3$), и прежде всего потому, что синтезировать это соединение относительно просто и недорого; возможно, это соединение будет использовано при лечении некоторых резистентных к витамину D костных заболеваний. В этом синтетическом стерине уже имеется функциональная гидроксильная группа при первом углеродном атоме (рис. 5), вследствие чего это соединение активно у животных, лишенных почек. Активность $1\alpha$-OH-$D_3$ in vivo очень близка к активности природного гормона $1\alpha$,25-$(OH)_2$-$D_3$. Этот стерин так же быстро стимулирует всасывание кальция, как и $1\alpha$,25-$(OH)_2$-$D_3$, а в хронических опытах его антирахитическое действие ничем не отличается от действия природного гормона [11]. Зервек и др. [56] недавно обнаружили, что $1\alpha$-OH-$D_3$ действует за счет превращения в $1\alpha$,25-$(OH)_2$-$D_3$, а не как истинный аналог гормона. Толчком к постановке прямых экспериментов, доказывающих, что $1\alpha$-OH-$D_3$ служит предшественником $1\alpha$,25-$(OH)_2$-$D_3$, послужило следующее наблюдение. Хотя эффективность $1\alpha$-OH-$D_3$ in vivo равна эффективности природного гормона, для вытеснения меченого $1\alpha$,25-$(OH)_2$-$D_3$ из комплексов с рецепторами кишечника in vitro концентрация синтетического стерина должна быть на 2—3 порядка выше концентрации природного гормона [32]. Можно надеяться, что использование данного молекулярного теста для соединений группы витамина D позволит в дальнейшем создать аналоги витамина D, которые будут, возможно, более активными, чем $1\alpha$,25-$(OH)_2$-$D_3$. Такие стерины найдут важное практическое применение при лечении гипокальцемических расстройств.

По способности вытеснять $1\alpha$,25-$(OH)_2$-$D_3$ из комплексов с рецепторами 25-OH-$D_3$ является наиболее эффективным природным стерином (концентрация 25-OH-$D_3$ должна превышать концентрацию природного гормона лишь в 500 раз). Поэтому с помощью молекулярных тестов на соединения группы витамина D можно получить данные о вероятном механизме токсического действия витамина D. Витамин D относится к тем немногим витаминам, которые в сверхфизиологических дозах оказывают вредное влияние; причина же гипервитаминоза D выяснена недостаточно. Образование $1\alpha$,25-$(OH)_2$-$D_3$ строго контролируется на уровне почечной $1\alpha$-гидроксилазы [5], а 25-гидроксилаза, превращающая витамин D в 25-OH-$D_3$, возможно, не регулируется по механизму обратной связи [3]. Поэтому фармакологические дозы витамина $D_2$ в результате метаболизма могли бы давать 25-OH-$D_2$ в количестве, достаточном для постоянного насыщения физиологических рецепторов $1\alpha$,25-$(OH)_2$-$D_3$ в кишечнике и костях, вызывая тем

самым неконтролируемый перенос кальция и в конце концов гиперкальцемию. Следовательно, токсическим агентом при гипервитаминозе D может быть 25-OH-$D_2$; ключом для понимания патогенеза этого заболевания является отсутствие регуляции 25-гидроксилирования витамина D плюс способность 25-OH-$D_2$ действовать на рецепторные места. Концентрация 25-OH-$D_3$ в крови здоровых людей равна 20 нг/мл [49], т. е. приблизительно в 500 раз выше концентрации 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ (40 пг/мл); поэтому в нормальных условиях 25-OH-$D_3$ может конкурировать с природным гормоном. Следует, однако, учитывать возможное влияние связывающих белков плазмы на доступность 25-OH-$D_3$ для рецепторов 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ в кишечнике. Ясно, что когда эти плазменные белки насыщаются 25-OH-D (что может происходить при длительном лечении фармакологическими количествами витамина $D_2$, например 400 000 МЕд в день), избыток 25-OH-$D_2$ может имитировать действие гормона и хронически активировать рецепторы кишечника [5—7]. Еще один довод в пользу предположения о том, что токсическим агентом при гипервитаминозе D является 25-OH-$D_2$, получен в недавней работе Каунтса и др. [58], обнаруживших появление гиперкальцемии у лишенных почек детей после лечения большими дозами витамина $D_2$. Поскольку у таких детей биосинтез 1α,25$(OH)_2$-$D_2$ не мог происходить, было сделано заключение, что интоксикация под действием витамина D обусловлена чрезвычайно высоким содержанием 25-OH-$D_2$ (635 нг/мл).

Итак, изучение молекулярных основ действия 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ показало, что данный стерин функционирует посредством «двухступенчатого механизма» связывания, приводя в конечном счете к изменениям в активности генома кишечника. Таким образом, 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ наряду с альдостероном, дигидрогестостероном, эстрогенами, прогестероном и кортизолом следует относить к гормонам, которые регулируют специфические функции клетки за счет влияния на ядерный синтез РНК. Выяснение механизма действия 1α,25-$(OH)_2$-$D_3$ важно не только с точки зрения фундаментальной науки, но и с позиций потребностей практической медицины, поскольку оно открывает новые возможности в лечении метаболических костных заболеваний и других нарушений минерального обмена.

## Благодарность

Работа, представленная в этой главе, финансировалась из фондов USPHS AM 15781, фонда обучения USPHS gM0 1982, а также из фонда кардиологической ассоциации штата Аризона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. *DeLuca H. F.*, Fed. Proc., *33*, 2211 (1974).
2. *Ponchon G., Kennan A. L., DeLuca H. F.*, J. Clin. Invest., *48*, 2032 (1962).
3. *Tucker G., III, Gagnon R. E., Haussler M. R.*, Arch. Biochem. Biophys., *155*, 47 (1973).
4. *Lawson D. E. M., Fraser D. R., Kodicek E., Morris H. R., Williams D. H.*, Nature, *230*, 228 (1971).
5. *Haussler M. R.*, Nutr. Rev., *32*, 257 (1974).
6. *Haussler M. R., Boyce D. W., Littledike E. T., Rasmussen H.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *68*, 177 (1971).
7. *Tanaka Y., DeLuca H. F.*, Arch. Biochem. Biophys., *146*, 574 (1971).
8. *Corradino R. A.*, J. Cell Biol., *58*, 64 (1973).
9. *Raisz L. G., Trummel C. L., Holick M. F., DeLuca H. F.*, Science, *175*, 768 (1972).
10. *McNutt K. W., Haussler M. R.*, J. Nutr., *103*, 681 (1973).
11. *Cork D. J., Haussler M. R., Pitt M. J., Rizzardo E., Hesse R. H., Pechet M. M.*, Endocrinology, *94*, 1337 (1974).
12. *Jensen E. V., DeSombre E. R.*, Science, *182*, 126 (1973).
13. *O'Malley B. W., Means A. R.*, Science, *183*, 610 (1974).
14. *Tsai H. C., Midgett R. J., Norman A. W.*, Arch. Biochem. Biophys., *157*, 339 (1973).
15. *Corradino R. A.*, Nature, *243*, 41 (1973).
16. *Zerwekh J. E., Haussler M. R., Lindell T. J.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *71*, 2337 (1974).
17. *Wasserman R. H., Taylor A. N.*, J. Biol. Chem., *243*, 3987 (1968).
18. *Corradino R. A., Wasserman R. H.*, Science, *172*, 731 (1972).
19. *Emtage J. S., Lawson D. E. M., Kodicek E.*, Nature, *246*, 100 (1973).
20. *Haussler M. R., Norman A. W.*, Arch. Biochem. Biophys., *118*, 145 (1967).
21. *Haussler M. R., Myrtle J. F., Norman A. W.*, J. Biol. Chem., *243*, 4055 (1968).
22. *Holick M. F., Schnoes H. K., DeLuca H. F., Suda T., Cousins R. J.*, Biochemistry, *10*, 2799 (1971).
23. *Haussler M. R., Norman A. W.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *62*, 155 (1969).
24. *Haussler M. R.*, Ph. D. Thesis, University of Califronia, Riverside, 1968.
25. *Fang S., Anderson K. M., Liao S.*, J. biol. Chem., *244*, 6584 (1969).
26. *Herman T. S., Fimognari G. M., Edelman I. S.*, J. Biol. Chem., *243*, 3849 (1968).
27. *Baxter J. D., Tomkins G. M.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *65*, 709 (1970).
28. *Brumbaugh P. F., Haussler M. R.*, J. Biol. Chem., *249*, 1251 (1974).
29. *Tsai H. C., Norman A. W.*, J. Biol. Chem., *248*, 5967 (1973).
30. *Haussler M. R.*, Steroids, *20*, 639 (1972).
31. *Holick M. F., Kleiner-Bossaller A., Schnoes H. K., Kasten P. M., Boyle I. T., DeLuca H. F.*, J. Biol. Chem., *248*, 6691 (1973).
32. *Brumbaugh P. F., Haussler M. R.*, Life Sci., *13*, 1737 (1973).
33. *Holick M. F., Garabedian M., Schnoes H. K., DeLuca H. F.*, J. Biol. Chem., *250*, 226 (1975).
34. *Brumbaugh P. F., Haussler M. R.*, Biochem. Biophys. Res. Communs., *51*, 74 (1973).
35. *Brumbaugh P. F., Haussler M. R.*, J. Biol. Chem., *249*, 1258 (1974).
36. *Haddad J. G., Birge S. J.*, J. Biol. Chem., *250*, 299 (1975).
37. *Brumbaugh P. F., Haussler M. R.*, Life Sci., *16*, 353 (1975).
38. *Santi D. V., Sibley C. H., Perriard E. R., Tomkins G. M., Baxter J. D.*, Biochemistry, *12*, 2412 (1973).
39. *Brumbaugh P. F., Haussler M. R.*, J. Biol. Chem., *250*, 1588 (1975).
40. *Notides A. C., Nielson S.*, J. Biol. Chem., *249*, 1866 (1974).
41. *Brumbaugh P. F.*, Ph. D. Thesis, University of Arizona, Tucson, 1975.
42. *Darnell J. E., Jelinek W. R., Molloy G. R.*, Science, *181*, 1215 (1973).
43. *Sica V., Parikh I., Nola E., Puca G. A., Cuatrecasas P.*, J. Biol. Chem., *248*, 6543 (1973).

44. *Smith R. G., Iramain C. A., Buttram V. C., O'Malley B. W.*, Nature, *253*, 271 (1975).
45. *O'Malley B. W., Spelsberg T. C., Schrader W. T., Chytil F., Steggles A. W.*, Nature, *235*, 141 (1972).
46. *Stein G. S., Stein J. S., Kleinsmith L. J.*, Sci. Am., *232*, 47 (1975).
47. *Jungmann R. A., Hiestand P. C., Schweppe J. S.*, Endocrinology, *94*, 168 (1974).
48. *Paul J.*, Nature, *238*, 444 (1972).
49. *Haddad J. G., Chyu K. J.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *33*, 992 (1971).
50. *Belsey R., DeLuca H. F., Potts J. T., Jr.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *33*, 554 (1971).
51. *Brumbaugh P. F., Haussler D. H., Bressler R., Haussler M. R.*, Science, *183*, 1089 (1974).
52. *Brumbaugh P. F., Haussler D. H., Bursac K. M., Haussler M. R.*, Biochemistry, *13*, 4091 (1974).
53. *Korenman S. G.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *28*, 127 (1968).
54. *Haussler M. R.*, unpublished work, 1974.
55. *Haussler M. R., Bursac K. M., Hughes M. R., Brumbaugh P. F.*, Clin. Res., *23*, 11A (1975).
56. *Zerwekh J. E., Brumbaugh P. F., Haussler D. H., Cork D. J., Haussler M. R.*, Biochemistry, *13*, 4097 (1974).
57. *Haddad J. G., Hahn T. J.*, Nature, *244*, 515 (1973).
58. *Counts S. J., Baylink D. J., Shen F., Sherrard D. J., Hickman R. O.*, Ann. Int. Med., *82*, 196 (1975).

## Глава 14

# ВЫЯВЛЕНИЕ β-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ

*Р. ЛЕФКОВИЦ*

Departments of Medicine and Biochemistry
Duke University Medical Center
Durham, North Carolina

## I. ВВЕДЕНИЕ

Физиологические эффекты катехоламинов (пирокатехинаминов) опосредуются двумя типами адренорецепторов — α и β [1]. α-Рецепторы опосредуют, к примеру, сосудосуживающее и бронхосуживающее действие катехоламинов. Через β-рецепторы осуществляется широкий спектр адренергических эффектов, включая влияние на частоту и силу сердечных сокращений, липолиз в жировой ткани, расслабление гладких мышц сосудов, бронхов и матки. α и β-Адренорецепторы сильно различаются по сродству к адренергическим лигандам. α-Рецепторы хорошо взаимодействуют с адреналином и норадреналином, но не взаимодействуют или взаимодействуют слабо с изопротеренолом. Специфические α-адренергические антагонисты, например фентоламин, обладают высоким сродством к рецепторам этого типа, в то время как β-адренергические антагонисты типа пропранолола таким свойством не обладают. И наоборот, изопротеренол является сильным агонистом для α-адренергических рецепторов; норадреналин же действует значительно слабее. Пропранолол — сильный антагонист конкурентного типа, тогда как фентоламин неактивен.

## II. β-АДРЕНЕРГИЧЕСКИЕ РЕЦЕПТОРЫ И АДЕНИЛАТЦИКЛАЗА

К настоящему времени значение связывания α-рецепторами адренергических соединений для последующих биохимических реакций точно не установлено. Напротив, связывание β-адренергических рецепторов катехоламинами, как было неоднократно показано, часто, если не всегда, сопровождается активацией аденилатциклазы [2]. Образующийся затем цАМФ, за счет активации специфических протеинкиназ, по-видимому, опосредует многие из физиологических β-адренергических эффектов.

Исследования ряда лабораторий свидетельствуют о том, что сопряженные с аденилатциклазой β-адренорецепторы полностью идентичны физиологическим β-адренорецепторам [3—7]. Эти β-рецепторы обладают всеми теми свойствами, включая и специфичность, которые следовало ожидать на основе физиологических и фармакологических исследований на цельных тканях [8].

## III. ПУТИ К ВЫЯВЛЕНИЮ β-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ

Наличие простого теста на активность фермента (аденилатциклазы), являющегося одним из наименее отдаленных от β-адренорецепторов звеньев в цепи действия катехоламинов, послужило стимулом к попыткам выделить непосредственно сами рецепторы. В большинстве таких работ пытались получить связывание меченых β-адренергических лигандов с рецепторными участками различных мембранных фракций, содержащих аденилатциклазу. Присутствие в таких фракциях чувствительной к катехоламинам аденилатциклазы дает в руки экспериментатора мощный инструмент для сравнения и подтверждения результатов изучения связывания. Можно ожидать, что свойства β-адренергических рецепторов, обнаруживаемые при непосредственном изучении связывания, будут близки к их свойствам, предсказанным на основании исследований активации катехоламинами аденилатциклазы.

## IV. КРИТЕРИИ ВЫЯВЛЕНИЯ β-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ

Основные критерии выделения β-адренергических рецепторов в экспериментах по прямому изучению связывания касаются специфичности, сродства и кинетики наблюдаемого связывания [9]. Специфичность β-адренорецепторов хорошо охарактеризована в большом количестве работ, в которых использовались и интактные ткани [8], и мембраны клетки (аденилатциклаза) [6]. Конкурентная эффективность β-адренергических агонистов и антагонистов при взаимодействии со связывающими местами должна строго соответствовать способности этих соединений усиливать или конкурентно ингибировать активирующее действие катехоламинов на аденилатциклазу. Более того, способность этих соединений связываться с рецепторами в такой же мере должна зависеть от их пространственной структуры, как и способность взаимодействовать с аденилатциклазой ((—)-изомеры значительно активнее (+)-изомеров). Аналогичным образом значения равновесных констант диссоциации ($K_d$) взаимодействия различных адренергических агентов с рецепторами, полученные при прямом измерении связывания, должны в определенной мере соответствовать значениям, определенным на основании данных по активации фермента. Сказанное отнюдь не означает, что измеряемые двумя способами величины обязательно должны совпадать. Определение

констант диссоциации взаимодействия веществ с их рецепторами с помощью прямых измерений связывания должно давать значения, наиболее близкие к истинным. В то же время такое определение на основе исследований по влиянию изучаемых соединений на аденилатциклазу или чисто фармакологических исследований, проводимых на цельной ткани, всегда осложнено существованием множества факторов, участвующих в сопряжении этапов связывания данного вещества рецепторами и физиологического ответа. Тем не менее следует ожидать, что между константами диссоциации, определенными по результатам связывания и по влиянию на аденилатциклазу, будет выявлено по крайней мере хорошее соответствие.

Процесс взаимодействия β-адренергических агентов с аденилатциклазой, сопряженной с β-адренорецепторами, протекает очень быстро [7, 10, 11]. Несколько групп исследователей независимо друг от друга установили, что стимулирующее действие агонистов на аденилатциклазу или ингибирующее влияние антагонистов достигается в пределах 1 мин [7, 10, 11]. В соответствии с этим скорости ассоциации меченых адренергических лигандов со связывающими местами предполагаемых β-адренергических рецепторов и диссоциации образующихся комплексов должны быть относительно высокими.

## V. ПОПЫТКИ ПОМЕТИТЬ β-АДРЕНЕРГИЧЕСКИЕ РЕЦЕПТОРЫ $^3$Н-АНТАГОНИСТАМИ КАТЕХОЛАМИНОВ

С 1969 г. рядом исследовательских групп начата работа по изучению возможности использовать меченные тритием катехоламины для идентификации β-адренорецепторов в различных препаратах мембран и в интактных клетках. Были опубликованы результаты изучения связывания мембранами печени [12—16], сердца [17—19], эритроцитов индейки [20—22], скелетных мышц [23], гладкомышечных клеток матки [24], капсулы селезенки [25], жировой ткани [26], клеток глии [27], культуры клеток сердца [28, 29] и адипоцитов [26, 30, 31]. Кинетика процесса связывания в различных системах сильно различалась: в одних случаях ассоциация и диссоциация происходили очень быстро [20, 21], в других — значительно медленнее [18, 27].

Практически во всех случаях, однако, специфичность связывания была очень сходной. Главное требование к структуре соединений для их взаимодействия с местами связывания катехоламинов заключалось в необходимости присутствия катехоловой группы. β-Адренергические агонисты, обладавшие такой группой, эффективно конкурировали за связывающие места, тогда как α-адренергические агонисты, которые обычно лишены катехоловой группы, конкурировали значительно слабее или совсем не конкурировали. Связывание $^3$Н-катехоламинов подавлялось и β-адренергическими

антагонистами, но для этого требовались очень высокие концентрации адренолитиков ($>10^{-4}$ М). α-Адренергические антагонисты были неактивны при всех исследованных концентрациях. В некоторых системах области концентраций β-адреномиметиков, в которых они конкурировали за связывающие места и в которых они вызывали физиологические эффекты, совпадали [29, 30].

Несмотря на указанное сходство в специфичности и сродстве к лигандам, между выявляемыми в эксперименте местами связывания $^3$H-катехоламинов и теоретически предсказываемыми β-адренергическими рецепторами, имеется ряд существенных различий в их свойствах (критерии для идентификации β-рецепторов приведены выше, а также в других работах) [9, 32]. Между местами связывания $^3$H-катехоламинов и β-адренорецепторами имеются два основных отличия в плане их специфичности. Во-первых, связывающие места не обладают стереоспецифичностью, характерной для β-адренергического действия: (+)- и (—)-изомеры катехоламинов обладают одинаковым сродством к этим местам. Во-вторых, за связывающие места с $^3$H-катехоламинами конкурируют многие физиологически неактивные соединения, содержащие катехоловую группу (включая и сам катехол).

*Сродство* связывающих мест к β-адренергическим антагонистам оказывается значительно ниже (на несколько порядков) тех величин, которые можно было бы предсказать на основании имеющихся данных о высоком сродстве этих агентов к физиологическим β-адренорецепторам.

*Кинетика* процессов связывания и диссоциации $^3$H-катехоламинов в некоторых системах также оказывается несколько более медленной, чем можно было ожидать на основании данных об очень высокой скорости стимуляции аденилатциклазы под действием катехоламинов и ее ингибирования под влиянием антагонистов. Так, например, в мембранах клеток сердечной мышцы связывание не достигает равновесного состояния даже за 1—2 ч при 37° С [18]. Обратная реакция протекает также очень медленно. Следует отметить, однако, что не всегда катехоламины взаимодействуют со связывающими местами так медленно. Например, для установления равновесия в связывании культурой клеток сердца требуется ~10 мин [29], а в связывании мембранами эритроцитов индейки 1—2 мин; $t^1/_2$ диссоциации при этом составляет <30 с [20—22].

## VI. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ФЕНОМЕНА СВЯЗЫВАНИЯ $^3$H-КАТЕХОЛАМИНОВ

В течение уже нескольких лет ведется полемика по поводу физиологической значимости обнаруженных связывающих мест. И как ни много по этому поводу было написано, мало что удалось действительно установить. Несомненно, что эти места связывают β-адренергические катехоламины в том же диапазоне концентра-

ций этих соединений, в котором проявляется их физиологическое действие. Более того, связывающие места, по-видимому, каким-то образом связаны с модулирующим или медиаторным биологическим действием катехоламинов. Указанные выше несоответствия не укладываются в более ранние представления, согласно которым если и не все связывание, то, во всяком случае, подавляющая его часть обусловлена интактными физиологическими β-адренергическими рецепторами. Но, с другой стороны, ряд других точек зрения, выдвинутых для объяснения полученных данных, также, по-видимому, не выдерживает критики.

Кватреказас и др. [33, 34] предположили, что наблюдаемое связывание $^3H$-катехоламинов обусловлено микросомной катехол-О-метилтрансферазой (КОМТ). Эта точка зрения основывалась на том же факте, что для обоих процессов (взаимодействие со связывающими участками и с КОМТ) характерна специфичность, определяемая катехоловой группой. Кроме того, по данным этих авторов, кофактор КОМТ S-аденозилметионин оказывал стимулирующее влияние на процесс связывания. Однако несколько групп исследователей опровергли эту гипотезу [31, 35, 36]. Было обнаружено, что многие сильные ингибиторы КОМТ не подавляют связывания [31, 36], а эффект S-аденозилметионина воспроизвести не удалось [35]. Более того, было показано, что некоторые свойства фермента, а также его тканевое и субклеточное распределение, резко отличаются от таковых для мест связывания $^3H$-катехоламинов [35].

Высказывалось также предположение, что «связывание» — это на самом деле процесс окисления, сопровождающийся необратимым связыванием модифицированных продуктов $^3H$-катехоламинов [27, 36]. Хотя в некоторых случаях часть связывания и может явиться результатом метаболизма $^3H$-катехоламинов, в ряде работ было убедительно показано, что для связывания характерна быстрая и практически полная обратимость, причем это не обусловлено разрушением $^3H$-катехоламинов [20—22]. Таким образом, теория «окисления» не дает объяснения феномену связывания катехоламинов.

К настоящему времени пока еще не удается создать простую модель, полностью удовлетворяющую результатам определения связывания. Вполне возможно, что связывающие $^3H$-катехоламины места гетерогенны, т. е. состоят из связывающих мест различного типа. Они могут окружать рецепторы и нерецепторные области мембран неизвестного назначения. Как уже указывалось, для разных систем интерпретация получаемых результатов может быть различной.

Несколько групп исследователей недавно обнаружили, что выявляемые in vitro свойства мест связывания $^3H$-катехоламинов можно изменять так, чтобы они приближались к свойствам, ожидаемым для β-адренорецепторов. Так, если изучение связывания

проводится в присутствии ЭДТА [16], то соединения, содержащие катехоловую группу (например, ДОФА), теряют способность конкурировать за связывающие места. Стереоспецифичности связывания, однако, пока выявить не удается.

Другой подход к преодолению возникших затруднений заключается в том, что инкубацию проводят в присутствии высоких концентраций пирокатехола [37]. Это физиологически неактивное соединение ингибирует связывание $^3$H-норадреналина мембранами клеток жировой ткани приблизительно на 96%. Около 50% того небольшого количества $^3$H-норадреналина, который продолжает оставаться связанным, может быть дополнительно вытеснено (—)-пропранололом ($10^{-6}$ М). На основе этих данных было высказано предположение [37], что вытесняемый (—)-пропранололом, но не вытесняемый пирокатехолом $^3$H-норадреналин связан с «истинными» β-адренергическими рецепторами. Для оценки правомерности такого подхода требуются, однако, дополнительные данные. Так, необходимо знать, является ли остаточное связывание стереоспецифичным, соответствует ли это связывание по своему сродству и специфичности β-адренорецепторам. Можно ожидать, что в большинстве систем (—)-пропранолол в концентрации $10^{-6}$ М будет вытеснять весь меченый лиганд, связанный β-адренорецепторами.

## VII. $^{125}$I-АГОНИСТЫ КАТЕХОЛАМИНОВ

Высказывалось предположение, что для более надежного выявления β-адренергических рецепторов с помощью методов прямого определения связывания потребуются лиганды, удельная радиоактивность которых значительно выше той, которая достигается при использовании $^3$H [38]. Это оказалось неверным. Как будет ясно из дальнейшего, β-адренорецепторы можно однозначно выявлять с помощью лигандов, меченных тритием. Более того, при выявлении рецепторов меченные до высокой удельной радиоактивности $^{125}$I-агонисты не обладают какими-либо преимуществами перед $^3$H-агонистами. Мы получили меченные $^{125}$I производные ряда активных β-адренергических катехоламиновых агонистов, содержащих оксифенильную группу при азоте аминогруппы. В качестве иллюстрации можно привести соединение «Cc 34» («Phillips Duphar», Голландия). Ниже приведена его структурная формула:

Присоединение иода проводили по модифицированному методу Хантера — Гринвуда [39]. Удельная радиоактивность меченого продукта составляла 50—100 Ки/ммоль, что значительно выше радиоактивности препаратов тритированных катехоламинов, поступающих в продажу. Сродство этого соединения к β-адренорецепторам весьма высоко и значительно превышает сродство (—)-изопротеренола [11]. Мы исследовали связывание данного соединения с мембранами миокарда и эритроцитов[1]. Несмотря на высокую удельную радиоактивность этого соединения и его очень высокое сродство к рецепторам, результаты определения связывания были полностью идентичными тем, которые получены с $^3$H-норадреналином или $^3$H-изопротеренолом. Это связывание не является стереоспецифичным, оно ингибируется физиологически неактивными катехоловыми соединениями. Ясно, что сама по себе высокая удельная радиоактивность — условие, еще недостаточное для выявления связывающих мест, обладающих всеми свойствами β-адренергических рецепторов.

## VIII. ВЫЯВЛЕНИЕ β-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ С ПОМОЩЬЮ АНТАГОНИСТОВ, СОДЕРЖАЩИХ РАДИОАКТИВНУЮ МЕТКУ

Неоднозначность результатов, полученных при изучении связывания $^3$H-катехоламинов, послужила толчком к поискам меченых лигандов, которые позволили бы более надежно и специфично выявлять β-адренорецепторы. Поэтому не удивительно, что внимание исследователей привлекли конкурентные β-адренергические антагонисты, обладающие высоким сродством и специфичностью. Идея использования этих антагонистов для выявления β-андренергических рецепторов не нова. Еще в 1967 г. Поттер [40] изучал связывание $^3$H-пропранолола тканью предсердий и их фрагментов у морских свинок. Полученные данные свидетельствовали о ненасыщаемости и неспецифичности мест связывания данного соединения в исследуемой ткани, что сделало невозможным выявление истинных β-адренергических рецепторов. Позднее с помощью метода фильтрации через миллипоровые фильтры мы обнаружили связывающие места для $^3$H-(—)-пропранолола в мембранной фракции миокарда желудочка собаки [41]. Но и в этом случае свойства связывающих мест сильно отличались от тех свойств, которыми должны были, по-видимому, обладать β-адренорецепторы. Места связывания пропранолола, отличные от β-рецепторов, были обнаружены во многих других мембранных фракциях, включая микросомы печени крыс [42] и синаптосомы мозга мышей [43]. Физиологическое значение этих связывающих мест (если таковое имеется) неясно. Эти места могли бы служить для хранения дан-

[1] Неопубликованные наблюдения Ц. Макхерджи и Р. Лефковица.

ного препарата в ткани и для регуляции его поступления к рецепторам [44]. С другой стороны, связывающие места могли бы иметь отношение к «стабилизирующему» действию пропранолола на мембраны. Однако ярко выраженная способность пропранолола блокировать β-адренергическое действие свидетельствует о том, что данное соединение связывается β-адренорецепторами. Таким образом, единственный вывод, который можно сделать на основе

**Рис. 1.** Строение (—)-алпренолола. Обозначены вероятные участки присоединения трития.

описанных выше данных по определению связывания, заключается в том, что $^3$H-пропранолол связывается не только с β-адренергическими рецепторами, но и с другими местами. Последний тип связывания, обнаруживаемый в самых различных экспериментальных условиях, препятствует выявлению β-адренорецепторов.

Позднее в эритроцитах лягушек [11, 45—48] и в миокарде собак [49] мы обнаружили связывающие места для меченого β-адренергического антагониста $^3$H-(—)-алпренолола. Эти участки обладают, по-видимому, всеми теми свойствами, которые должны быть присущи местам связывания β-адренорецепторов. Структура (—)-алпренолола показана на рис. 1. Присутствие в молекуле этого соединения двойной связи в алифатической боковой цепи при С-2 фенольного кольца делает (—)-алпренолол особенно удобным для каталитического восстановления газообразным тритием. Данная процедура позволяет ввести два атома трития в одну молекулу алпренолола, что обеспечивает высокую удельную радиоактивность получаемого продукта (17—33 Ки/ммоль). Хотя возникающее в результате тритирования соединение мы обозначили как $^3$H-(—)-алпренолол, было бы правильнее называть его «$^3$H-(—)-дигидроалпренолол». Однако при проведении тритирования этот изотоп может обмениваться с атомами $^1$H не только по месту двойной связи, но и в других участках молекулы, что приведет к образованию $^3$H-(—)-алпренолола. Полученный меченый препарат по хроматографическим свойствам и биологической активности идентичен исходному (—)-алпренололу [11].

Связывание $^3$H-(—)-алпренолола мембранными фракциями мы изучали с помощью центрифугирования. Свойства связывающих мест мембран эритроцитов лягушек и миокарда собак оказались очень близкими.

С другой стороны, эти свойства почти идентичны тем, которыми должны обладать связывающие места β-адренергических рецепторов [11, 45—49].

Связывание $^3$H-(—)-алпренолола происходит очень быстро: равновесие достигается в пределах 2—3 мин при 37° С. Высокая скорость характерна и для процесса диссоциации комплексов меченого антагониста с мембранными местами связывания: $t_{1/2}$ этого процесса для мембран эритроцитов составляет 30 с [11], а для мембран миокарда — менее 15 с [49]. Быстрая кинетика связывания коррелирует с быстрым «включением» и «выключением» действия β-адренергических агентов на аденилатциклазу. Известно, что максимальная стимуляция данного фермента под действием изопротеренола наступает в течение 1 мин [11]. Сходным образом β-адренергические антагонисты полностью подавляют стимулирующее действие катехоламинов за 30—60 с.

Сродство различных β-адренергических агентов к местам связывания $^3$H-(—)-алпренолола прямо пропорционально активности этих соединений в качестве β-адренергических агонистов или антагонистов в отношении аденилатциклазы или цельной ткани. Для изучения связи между структурой и активностью различных соединений мы провели большую серию экспериментов по сопоставлению способности широкого спектра адренергических агентов взаимодействовать с аденилатциклазой эритроцитов и сердечной мышцы и влиять на связывание $^3$H-(—)-алпренолола [11, 49]. Активность изученных соединений по этим двум тестам во всех случаях оказалась одинаковой. Обнаруженную корреляцию можно проиллюстрировать на примерах, приведенных на рис. 2, *А*, *Б* и 3, *А*, *Б*. Рис. 2 дает представление о соотношении активности агонистов по тесту стимуляции аденилатциклазы мембран эритроцитов лягушек и по тесту взаимодействия с местами связывания $^3$H-(—)-алпренолола. В обоих случаях активность агонистов располагается в следующем классическом для β-адренорецепторов порядке: (—)-изопротеренол > (—)-адреналин ≫ (—)-норадерналин. Более того, и для действия на аденилатциклазу, и для вытеснения $^3$H-(—)-алпренолола из мест связывания характерна ярко выраженная стереоспецифичность: активность (—)-изомеров каждого из агонистов в обоих случаях оказывается на 1—3 порядка выше активности (+)-изомеров.

Сходная ситуация имеет место и в случае антагонистов (рис. 3). С помощью графиков Шильда [50] было установлено, что по антагонистическому действию изопротеренола на аденилатциклазу (—)-изомеры сильных β-адренергических антагонистов — алпренолола и пропранолола — примерно на 2 порядка активнее (+)-изомеров. Как показано на рис. 3, *Б*, та же закономерность прослеживается и в отношении способности изомеров конкурировать с $^3$H-(—)-алпренололом за связывающие места.

Аналогичные данные для большого количества адренергичес-

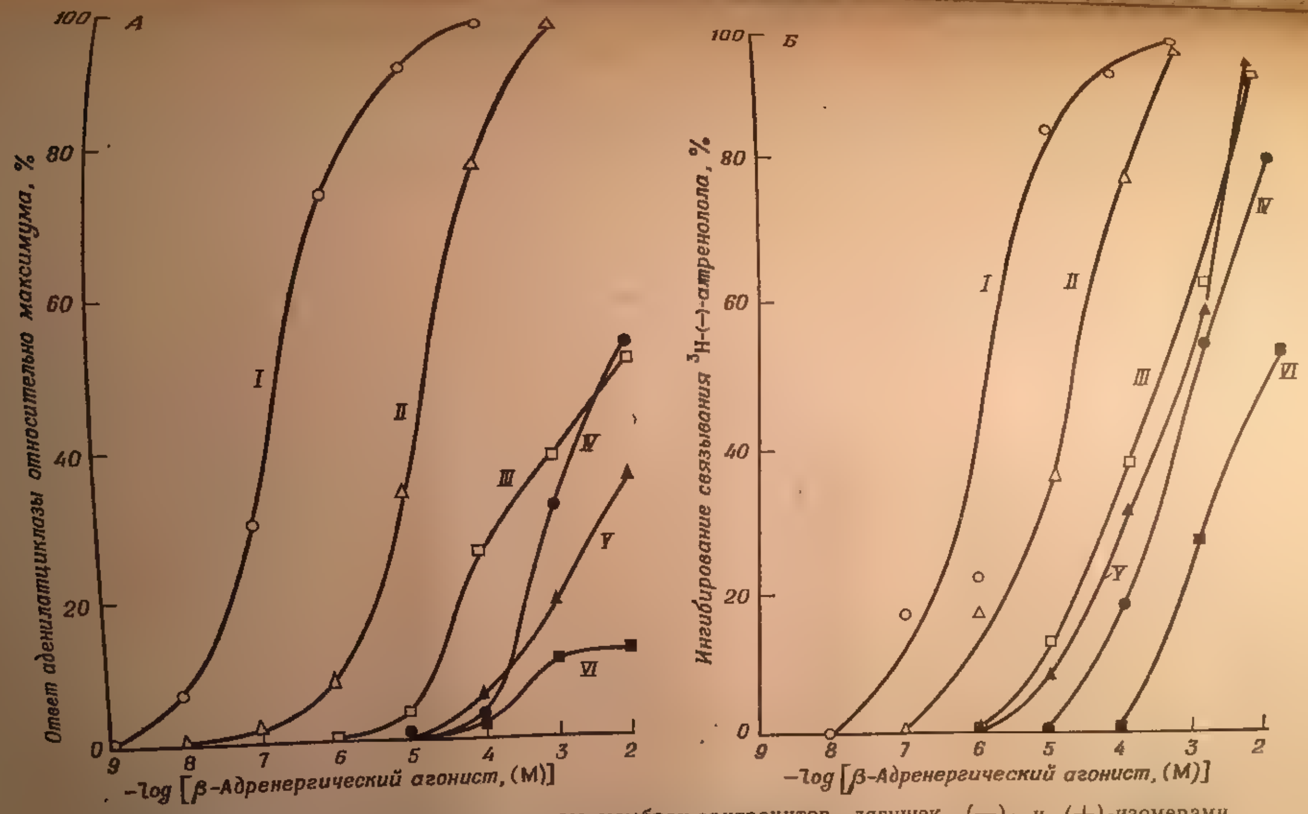



**Рис. 2.** *А*. Стимуляция аденилатциклазы мембран эритроцитов лягушек (—)- и (+)-изомерами β-адренергических агонистов [11]. *Б*. Ингибирование связывания $^3$H-(—)-алпренолола изомерами β-адренергических агонистов [11]. *I* - (—)-изопротеренол, *II* — (—)-адреналин, *III* — (—)-норадреналин, *IV* — (+)-изопротеренол, *V* — (+)-адреналин, *VI* — (+)-норадреналин. Детали использованных методов тестирования были описаны в работе [11].

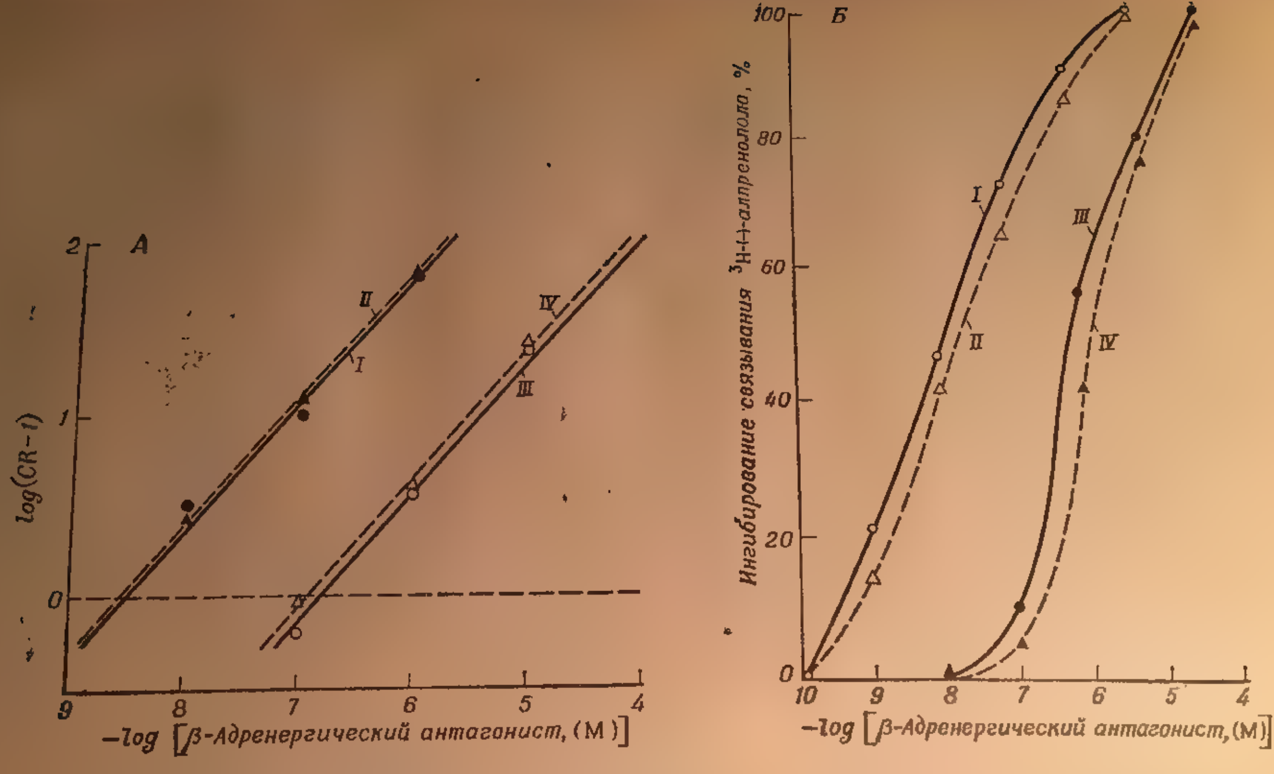



**Рис. 3.** *А.* Графики Шильда [50] для описания конкурентного ингибирования чувствительной к катехоламинам аденилатциклазы мембран эритроцитов лягушек (—)- и (+)-изомерами β-адренергических антагонистов [11]. Были сняты кривые доза — ответ для концентраций изопротеренола от $10^{-7}$ до $10^{-4}$ М в присутствии или в отсутствие трех фиксированных концентраций каждого из антагонистов. CR обозначает отношение концентраций изопротеренола, оказывающих одинаковое воздействие в присутствии и в отсутствие антагониста в данной концентрации. *Б.* Ингибирование связывания $^3$H-(—)-алпренолола мембранами эритроцитов лягушек под действием (—)- и (+)-изомеров β-адренергических антагонистов *I* — (—)-алпренолол, *II* — (—)-пропранолол, *III* — (+)-алпренолол, *IV* — (+)-пропранолол.

*Таблица 1*

**Сродство адренергических агонистов к местам связывания $^3$Н-(—)-алпренолола и к β-адренорецепторам, сопряженным с аденилатциклазой [11]**

| Агонист | Стерео-изомеры | Полумаксимальное ингибирование связывания $^3$Н-(—)-алпренолола, мкМ | Полумаксимальная стимуляция аденилатциклазы, мкМ[1] |
|---|---|---|---|
| Норадреналин | (—) | 250 | 150* |
| | (+) | 1000 | — |
| Адреналин | (—) | 20 | 15 |
| | (+) | 600 | 800* |
| Изопротеренол | (—) | 2 | 0,3 |
| | (+) | 800 | 700* |
| Cc-34 (Phillips-Duphar) | (±) | 0,3 | 0,1 |
| Cc-25 (Phillips-Duphar) | (±) | 4 | 0,55 |
| Протокилол | (±) | 4 | 0,4 |
| Сотеренол | (±) | 4,5 | 1,5* |
| MJ 9184 | (±) | 0,07 | 0,08* |

[1] Звездочки указывают, что максимальная стимуляция аденилатциклазы под действием данного соединения была ниже, чем под действием (—)-изопротеренола. В таких случаях «полумаксимальная стимуляция аденилатциклазы» относится к такой концентрации данного соединения, которая вызывает половину от максимального действия этого агента. Минус означает, что активность (+)-норадреналина была настолько низка, что достаточно точно определить его концентрацию, оказывающую полумаксимальное стимулирующее действие, не предоставлялось возможным.

ких агонистов и антагонистов приведены в табл. 1 и 2. Во всех исследованных случаях наблюдается соответствие между активностью соединения, определяемой по действию на аденилатциклазу и на связывание. Кроме указанных в таблицах соединений, в работе был исследован ряд соединений, лишенных обеих активностей. Например, физиологически неактивные соединения, содержащие катехоловую группу, такие, как (±)-ДОФА или диоксиминдальная кислота, не оказывают ни агонистического, ни антагонистического влияния и не конкурируют за места связывания $^3$Н-(—)-алпренолола. То же самое было установлено в отношении некоторых метаболитов катехоламинов и холинергических агентов [11].

Данные, приведенные в табл. 1 и 2, отчетливо показывают, что зависимость между структурой и активностью у изученных соединений одинакова в отношении сродства к местам связывания $^3$Н-(—)-алпренолола и к β-адренергическим рецепторам, сопряженным с аденилатциклазой. Эти результаты можно суммировать следующим образом. Сродство и агонистов, и антагонистов повыша-

Таблица 2

**Сродство адренергических антагонистов к местам связывания $^3H$-(—)-алпренолола и к β-адренорецепторам, сопряженным с аденилатциклазой [11]**

| Антагонист | Стереоизомеры | Полумаксимальное ингибирование связывания $^3H$-(—)-алпренолола, мкМ | Кажущаяся $K_d$[1] для активируемой изопротеренолом аденилатциклазы, мкМ |
|---|---|---|---|
| Алпренолол | (—) | 0,015 | 0,003—0,011 |
| | (+) | 0,8 | 0,17—0,25 |
| Пропранолол | (—) | 0,023 | 0,003—0,004 |
| | (+) | 1,5 | 0,14—0,22 |
| Дихлоризопротеренол | (±) | 3,5 | 0,2—0,23 |
| Сотолол | (±) | 15 | 1,1—2,1 |
| MJ 7434-1 | (±) | 100 | 4,0—4,5 |
| Бутоксамин | (±) | 40 | 1,6—3,0 |
| Практолол | (±) | 110 | 8—7,6 |
| Фенилэфрин | (±) | 270 | 20—25 |
| Метараминол | (±) | 180 | 20—22 |
| Фентоламин | | — | — |
| Феноксибензамин | | — | — |

[1] Величины «кажущихся $K_d$» для активируемой изопротеренолом аденилатциклазы определяли с помощью графиков Шильда, как указано в подписи к рис. 3, А. Минус обозначает, что антагонистическая активность данных соединений была слишком слабой для надежного определения измеряемых величин.

ется при замене атома водорода у аминного азота на крупную группировку, а также при изменении (+)-конфигурации на (—)-конфигурацию у асимметричного атома углерода. Сродство антагонистов, как правило, еще больше возрастает при наличии эфирной связи между этаноламиновой боковой цепью и ароматической группой. Интересно, что природа заместителей в катехоловом кольце катехоламинов не оказывает существенного влияния на сродство; этот факт находится в соответствии с результатами, полученными на целых тканях. В то же время изменение катехоловой части молекулы влияет прежде всего на «внутреннюю» (intrincic) активность самого соединения. Например, сродство к рецепторам изопротеренола и дихлоризопротеренола очень сходно, однако первое из этих соединений является агонистом, а второе — конкурентным антагонистом. То же самое имеет место в отношении норадреналина и фенилэфрина. Эти два соединения очень похожи: единственное различие состоит в том, что в фенилэфрине отсутствует одна гидроксильная группа в кольце. Это различие не оказывает сколько-нибудь существенного влияния на сродство (определяемое по тесту связывания или по тесту с аденилатциклазой), но приводит к полному исчезновению агонистической активности: норадреналин — агонист, фенилэфрин — конкурентный антагонист.

Эти данные еще раз подчеркивают тот факт, что связывание с β-рецепторами, по-видимому, зависит в первую очередь от стереохимии этаноламиновой боковой цепи и от природы заместителя при атоме аминного азота. Способность же «активировать» биологические процессы с помощью этих рецепторных механизмов определяется катехоловым ядром. Гранфелд и др. [4] подчеркнули, что лишь очень ограниченное количество модификаций катехолового кольца совместимо с «внутренней» агонистической активностью.

Хорошее соответствие обнаружено не только между способностью адренергических соединений взаимодействовать с местами связывания $^3$H-(—)-алпренолола и с β-адренергическими рецепторами, сопряженными с аденилатциклазой, но и между величинами $K_d$, полученными двумя способами тестирования (см. табл. 1 и 2). Следует, однако, отметить, что значения, полученные путем измерения связывания, часто (но не всегда) оказываются несколько большими, чем аналогичные значения, определенные на основании экспериментов по влиянию на фермент. Как уже подчеркивалось, непосредственное измерение связывания должно давать наиболее близкие к истинным величины констант диссоциации для взаимодействия лигандов с их рецепторами.

Приведенные данные показывают, что для идентификации связывающих мест в мембранах эритроцитов можно использовать $^3$H-(—)-алпренолол. Скорость взаимодействия таких мест с лигандами и специфичность этого взаимодействия соответствуют тому, что можно ожидать в случае β-адренергических рецепторов. Данный подход, очевидно, применим и для изучения рецепторных систем тканей млекопитающих. Те же методы промечивания β-адренергических рецепторов были нами использованы при работе с фракцией мембран из миокарда собак [49]. Свойства рецепторов сердечной мышцы оказались удивительно похожими на свойства рецепторов эритроцитов лягушек.

Выявленные с помощью $^3$H-(—)-алпренолола связывающие места β-адренергических рецепторов являются, по-видимому, липопротеидами и отличны от каталитической единицы аденилатциклазы [51]. Рецепторные связывающие места удалось с помощью детергентов солюбилизировать при полном сохранении их основных связывающих свойств [47]. Величины $K_d$ для взаимодействия адренергических соединений с солюбилизированными рецепторами и рецепторами, находящимися в препаратах мембран, практически одинаковы. Одинакова и стереоспецифичность этих рецепторов. Дальнейшее развитие методов солюбилизации будет способствовать созданию методов их очистки в будущем.

## IX. РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

Уже достаточно давно известен феномен так называемой потери специфической чувствительности, заключающийся в исчезновении способности ткани реагировать на какой-либо лекарственный

препарат или гормон после длительной экспозиции ткани в присутствии высокой концентрации данного соединения [52]. Недавно Рот и др. [53, 54] установили, что инсулиновая резистентность, всегда сопровождающая гиперинсулемию, связана со снижением в клетке количества рецепторов инсулина.

Эти наблюдения побудили нас проверить возможное влияние длительного связывания β-адренергических рецепторов на свойства рецепторов и на их чувствительность к катехоламинам. В качестве экспериментальной модели нами были выбраны эритроциты лягушек. Введение лягушкам β-адренергических катехоламинов приводит через 1—24 ч к постепенному падению чувствительности аденилатциклазы мембран эритроцитов к стимулирующему действию катехоламинов [46]. Такое исчезновение чувствительности специфично именно для β-адренергической стимуляции, поскольку и базальная, и индуцируемая фторидом активности фермента при таком воздействии не менялись. Значительное снижение чувствительности аденилатциклазы у животных, получавших катехоламины, сопровождается соответствующим падением концентрации мест связывания β-адренергических рецепторов («$^3$H-(—)-алпренололсвязывающие участки»). Существенных изменений в величинах сродства связывания и $K_м$ для стимуляции аденилатциклазы изопротеренолом при этом не обнаружено [46]. Потеря чувствительности полностью обратима: если введение катехоламинов прекращают, то чувствительность к ним восстанавливается полностью. Приведенные данные позволяют думать, что длительное связывание β-адренорецепторами агонистов имеет регуляторное значение; в результате уменьшается количество рецепторов, а следовательно, снижается тканевая чувствительность к катехоламинам. Однако механизмы, с помощью которых осуществляется подобная регуляция, пока еще не изучены.

Описанные в этой главе методы прямого определения связывания могут быть с успехом использованы при изучении различных нарушений β-адренергической чувствительности. Работа в этом направлении будет способствовать выяснению роли повреждений рецепторов при нарушениях тканевой чувствительности к катехоламинам.

**Благодарность**

Автор хотел бы поблагодарить своих помощников и коллег, принимавших участие в разработке описанных здесь методов определения связывания: д-ров Ч. Макхерджи, М. Карона, Л. Лимбёрда и Р. В. Александера, а также Л. Т. Вильямса и М. Коверстоуна.

Работа финансировалась из фондов HEW HL-16037 и фонда Американской кардиологической ассоциации, а также частично из фонда кардиологической ассоциации штата Северная Каролина. Д-р Лефковиц является почетным членом Американской кардиологической ассоциации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ahlquist R. P.*, Am. J. Physiol., *153*, 586 (1948).
2. *Robison G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W.*, Cyclic AMP, Academic Press, London, 1971, pp. 145—131.
3. *Rosen O. M., Erlichman J., Rosen S. N.*, Mol. Pharmacol., *6*, 624—531 (1970).
4. *Grunfeld C., Grollman A. P., Rosen O. M.*, Mol. Pharmacol., *10*, 605—614 (1974).
5. *Mayer S. E.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. *181*, 116—125 (1972).
6. *Lefkowitz R. J.*, Biochem. Pharmacol., *24*, 583—590 (1975).
7. *Kaumann A. J., Birnbaumer L.*, J. Biol. Chem., *249*, 7874 (1975).
8. *Ariens E. J.*, Ann. NY Acad. Sci., *139*, 606 (1967).
9. *Lefkowitz R. J.*, Biochem. Pharmacol., *24*, 583 (1975).
10. *Bar H. P.*, Mol. Pharmacol., *10*, 597 (1974).
11. *Mukherjee C., Caron M. G., Coverstone M., Lefkowitz R. J.*, J. Biol. Chem., *250*, 4869 (1975).
12. *Marinetti G. V., Ray T. K., Tomasi V.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *36*, 185—193 (1969).
13. *Tomasi V., Koretz S., Ray T. K., Dunnick J., Marinetti G. V.*, Biochim. Biophys. Acta, *211*, 31 (1970).
14. *Dunnick J. K., Marinetti G. V.*, Biochim. Biophys. Acta, *249*, 122—134 (1971).
15. *Shlatz L., Marinetti G. V.*, Science, *176*, 175—177 (1972).
16. *Lacombe M. L., Hanoune J.*, Biochim. Biophys. Res. Commun., *58*, 667 (1974).
17. *Lefkowitz R. J., Haber E.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *68*, 1773 (1971).
18. *Lefkowitz R. J., Sharp G., Haber E.*, J. Biol. Chem., *48*, 342 (1973).
19. *Lefkowitz R. J., O'Hara D., Haber E.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 2828 (1972).
20. *Schramm M., Feinstein H., Naim E., Long M., Laser M.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 523 (1972).
21. *Bilzekian J. P., Aurbach G.*, J. Biol. Chem., *248*, 5774 (1973).
22. *Bilzekian J. P., Aurbach G.*, J. Biol. Chem., *248*, 5584 (1973).
23. *Vallieres J., Drummond G. I., Severson D. L.*, Fed. Proc., *32*, 773a (1973).
24. *Keller D., Goldfien A.*, Clin. Res., *21*, 202 (1973).
25. *Fiszer-dePlazas S., DeRobertis E.*, Biochim. Biophys. Acta, *266*, 246—254 (1972).
26. *Jarett L., Smith R., Crespin S.*, Endocrinology, *94*, 719 (1974).
27. *Maguire M. E., Goldmann P. H., Gilman A. G.*, Mol. Pharmacol., *10*, 563 (1974).
28. *Lefkowitz R. J., O'Hara D., Warshaw J.*, Nature [New Biol.], *244*, 79 (1973).
29. *Lefkowitz R. J., O'Hara D., Warshaw J.*, Biochim. Biophys. Acta, *332*, 317 (1974).
30. *Aprille J. R., Lefkowitz R. J., Warshaw J. B.*, Biochim. Biophys. Acta, *373*, 502 (1974).
31. *Koretz S. H., Marinetti G. V.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *61*, 22 (1974).
32. *Molinoff P. B.*, in: Frontiers in Catecholamine Research (E. Usdin and S. Snyder, eds.), Pergamon Press, New York, 1973, p. 357.
33. *Cuatrecasas P., Tell G. P. E., Sica V., Parikh I., Chang K.*, Nature, *247*, 92 (1974).
34. *Tell G. P. E., Cuatrecasas P.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *57*, 793 (1974).
35. *Lefkowitz R. J.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *58*, 1110 (1974).
36. *Wolfe B. M., Zirrolli J. A., Molinoff P. B.*, Mol. Pharmacol., *10*, 582 (1974).
37. *Pairault J., Laudat M. H.*, FEBS Lett., *50*, 61 (1974).
38. *Cuatrecasas P.*, N. Engl. J. Med., *291*, 206 (1974).
39. *Hunter W. M., Greenwood F. C.*, Nature, *194*, 495 (1962).
40. *Potter L. T.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., *155*, 91 (1967).
41. *Vatner D., Lefkowitz R. J.*, Mol. Pharmacol., *10*, 450 (1974).
42. *Huunan-Seppala A.*, Acta Chem. Scand., *26*, 2713 (1972).
43. *De Robertis E., Fiszer-dePlazas S.*, Life Sci., *8*, 1247 (1969).
44. *Furchgott R.*, in: Frontiers in Catecholamine Research (E. Usdin and S. Snyder, eds.), Pergamon Press, New York, 1973, p. 295.

45. *Lefkowitz R. J., Mukherjee C., Coverstone M., Caron M.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *60*, 703 (1974).
46. *Mukherjee C., Caron M., Lefkowitz R. J.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *72*, 1945 (1975).
47. *Caron M., Lefkowitz R. J.*, J. Biol. Chem., *251*, 2374 (1976).
48. *Lefkowitz R. J.*, in: Methods in Receptor Research (M. Blecher, ed.), Marcel Dekker, New York, 1975.
49. *Alexander R. W., Williams L. T., Lefkowitz R. J.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *72*, 564 (1975).
50. *Schild H. O.*, br. J. Pharmacol., *4*, 277 (1949).
51. *Limbird L., Lefkowitz R. J.*, Mol. Pharmacol. (1976).
52. *Waud D.*, Pharmacol. Rev., *20*, 49 (1968).
53. *Goldfine I. D., Kahn C. R., Neville D. M., Jr., Roth J., Carrison M. M., Bates R. W.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *53*, 852 (1973).
54. *Gavin J. R., III, Roth J., Neville D. M., Jr., DeMeyts P., Buell D. N.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *71*, 84 (1974).

## Глава 15

# ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ β-АДРЕНЕРГИЧЕСКИМИ РЕЦЕПТОРАМИ И АКТИВНОСТЬЮ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В ЭРИТРОЦИТАХ ИНДЕЙКИ

*ДЖ. БИЛЕЗИКЯН*[1]

Department of Medicine
College of Physicians and Surgeons
Columbia University
New York, New York

### I. ВВЕДЕНИЕ

Многие физиологические эффекты, связанные с действием β-адренергических катехоламинов, обусловлены активацией аденилатциклазы, приводящей к внутриклеточному накоплению циклического 3′5′-АМФ [1, 2]. β-Адренергические катехоламины способны активировать аденилатциклазу в гомогенатах эритроцитов птиц [3—5] и лягушек [6], а также в гомогенатах многих тканей млекопитающих. Согласно существующим представлениям, действие катехоламиновых агонистов начинается со связывания со специфичными для гормона рецепторными местами плазматической мембраны клетки-мишени. На некоторых тканях проводилось одновременное изучение чувствительной к гормону аденилатциклазы и связывания меченного тритием гормона с препаратами плазматических мембран [7—14]. Следует думать, что в результате сопоставления условий активации аденилатциклазы и специфического связывания гормона будет подтвержден тезис о причинной зависимости эффекта гормона (активация аденилатциклазы) от его первоначального взаимодействия с клеткой (связывание гормона с плазматической мембраной).

Эритроциты индейки представляют собой удобную модель для исследования β-рецепторной системы, поскольку: а) такой физиологический параметр, как стимуляция транспорта натрия, находится под контролем катехоламинов и внутриклеточной концентрации циклического АМФ [15—17]; б) плазматические мембраны содержат активную аденилатциклазу, чувствительную только к β-адренергическим катехоламинам; в) эритроциты легко получать в виде гомогенного препарата, свободного от клеток других типов и от нейрональных везикул, способных поглощать катехоламины;

---

[1] Главный инспектор Нью-йоркской кардиологической ассоциации Молли Бернса.

г) можно получать препараты плазматических мембран со стабильной аденилатциклазной и связывающей активностями. Было показано, что условия активации аденилатциклазы и связывания тритированных катехоламинов различны [11, 13, 14]. Недавно было получено иодированное производное катехоламинового аналога оксибензилпиндолола, активность которого исследовалась по аналогичной схеме [18]. В первой части настоящей главы будет дана сравнительная характеристика связывания меченного тритием изопротеренола и иодированного аналога оксибензилпиндолола и условий активации этими соединениями аденилатциклазы.

Первичный результат гормон-рецепторного взаимодействия — активации аденилатциклазы — чувствителен к гуаниловым нуклеотидам [19, 20]. Усиление (амплификация) чувствительной к гормону аденилатциклазы под действием гуаниловых нуклеотидов обнаружено в случае многих тканей и гормонов [21—25], в том числе и в эритроцитах индейки [16]. Этот эффект еще более ярко выражен при использовании аналога, гуанилилимидодифосфата (Гфф(NH)ф) [27, 28]. Во второй части главы будет рассмотрено влияние гуаниловых нуклеотидов на функционирование β-рецепторов. При этом особое внимание будет уделено действию нуклеотидов на уровне плазматической мембраны.

## II. МЕТОДЫ

*Выделение мембран эритроцитов.* Метод приготовления плазматических мембран эритроцитов индейки уже опубликован [11]. Чувствительные к гормону препараты оставались стабильными по крайней мере в течение 2 месяцев при их хранении в 0,25 М растворе сахарозы.

*Определение аденилатциклазы.* Метод измерений образования $^{32}P$-циклического 3′5′-АМФ из $^{32}P$-АТФ описан в другой работе [11]. Выделение циклического АМФ из реакционной смеси проводили по методу Саломана и др. [29]. Базальная активность аденилатциклазы (выраженная в пмолях на 1 мг белка за 10 мин) колебалась в пределах 1,5—6,8. Активность фермента, стимулированного изопротеренолом, составляла 12—55. Приведенные величины представляют собой средние значения результатов трех измерений.

*Иодирование оксибензилпиндолола.* Эта процедура была выполнена по методу Хантера и Гринвуда [30] с небольшими изменениями [18]. 0,4 мкг иодируемого соединения в 0,3 М фосфатном буфере (pH 7,6) инкубировали при комнатной температуре в течение 3 мин с 1 мКи свободного от носителя $^{125}I$ и 0,8 мкг хлорамина Т. Суммарный объем составлял 50 мкл. Реакцию прекращали добавлением 25 мкл метабисульфита натрия (7,2 мг/мл). Иодированный оксибензилпиндолол дважды экстрагировали в этилацетатную

фазу, полученную из смеси, содержащей равные объемы этилацетата, 1 н. уксусной кислоты и 0,02 М KI. Иодированное соединение хранили при 4° С в этилацетате в присутствии меркаптоэтанола и фенола (10 мг/мл). Удельная активность достигала 400 Ки/ммоль.

*Связывание $^{125}I$-оксибензилпиндолола.* Связывание иодированного оксибензилпиндолола плазматическими мембранами определяли, инкубируя последние (50 мкг на 100 мкл) с меченым лигандом (приблизительно $2 \cdot 10^{-10}$ М; 10 000 имп/мин на 100 мкл инкубационной смеси) в буфере, используемом для определения аденилатциклазной активности (без α-$^{32}$Р-АТФ). Конечный объем инкубационной смеси составлял 500 мкл. Температура инкубации равнялась 4° С, время инкубации — 60 мин. Связывание достигало состояния равновесия через 60 мин; количество связанного аналога оставалось на постоянном уровне в течение последующих 60 мин. Разделение метки, связанной с мембранами, и свободной метки осуществляли фильтрованием 100 мкл инкубационной смеси через стеклянные фильтры ватман 4752-L20 (проводили три параллельных определения). Фильтры промывали 15 мл холодного *трис*-буфера. Величина блэнка (радиоактивности, остающейся на фильтре в отсутствие плазматических мембран) составляла примерно 10—20% того количества радиоактивности, которое задерживалось на фильтре в присутствии мембранной фракции.

## III. РЕЗУЛЬТАТЫ

l-(—)-Изопротеренол стимулирует выброс натрия из интактных эритроцитов индейки. Полумаксимальная стимуляция этого процесса наблюдается при концентрации адреномиметика $10^{-8}$ М (рис. 1). Этот процесс и сопровождающее его повышение содержания цАМФ ингибируются β-адренергическим ингибитором пропранололом, но не фентоламином, относящимся к α-адренергическим ингибиторам. Эксперименты по изучению системы, в которой использовались препараты плазматических мембран эритроцитов индейки, показали, что полумаксимальная стимуляция аденилатциклазы достигается при концентрации l-(—)-изопротеренола $2 \cdot 10^{-6}$ М (рис. 2, *А*). Полумаксимальное ингибирование эффекта l-(—)-изопротеренола наблюдается при концентрации l-(—)-пропранолола $2 \cdot 10^{-7}$ М (рис. 2, *Б*). Влияние l-(—)-изомера на стимуляцию транспорта натрия, активацию и ингибирование аденилатциклазы является стереоспецифическим. Во всех случаях d-(+)-изомер был гораздо менее активен. Эритроциты индейки служат уникальным объектом в том отношении, что ни один другой гормон, кроме β-адренергических катехоламинов, не способен стимулировать в этих клетках транспорт натрия или активацию аденилатциклазы.

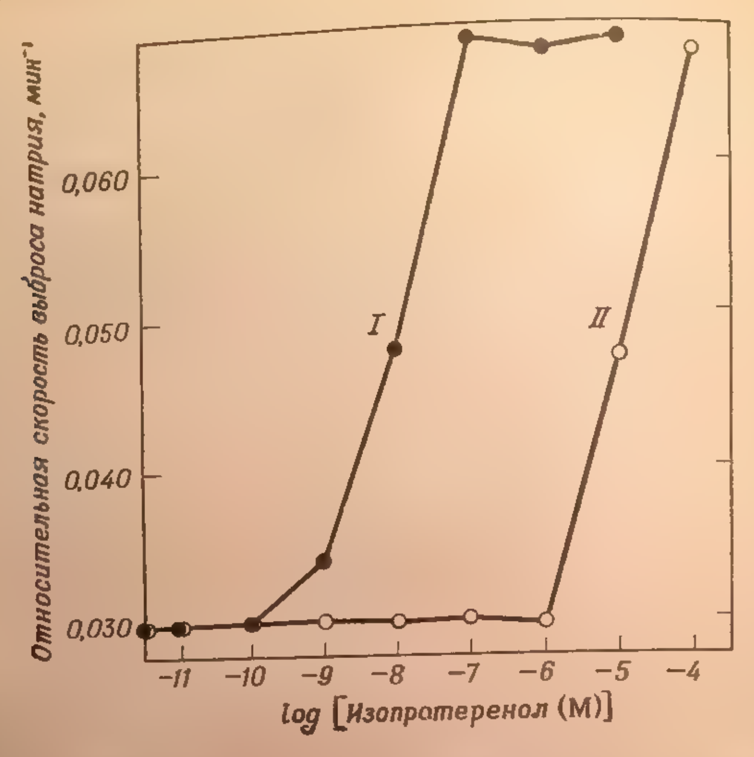



**Рис. 1.** Влияние изопротеренола на относительную скорость выброса натрия из эритроцитов индеек. Результаты получены с dl-изопротеренолом (*I*) и d-изопротеренолом (*II*). Каждая точка представляет собой среднее из четырех определений [14] (с разрешения Американского общества биохимиков).

## А. Структурная специфичность активации аденилатциклазы и связывания катехоламинов

В эритроцитах индейки активность аденилатциклазы стимулируется катехоламинами (табл. 1). Для активирующего действия этих соединений необходимо наличие следующих условий: гидроксилирование фенильного кольца (катехоловая группа) в положениях 3 и 4, гидроксилирование β-углеродного атома, а также наличие первичной или вторичной аминогруппы при α-углеродном атоме (атаноламиновая группа). Как правило, активность соединения положительно коррелирует с размером алкильного заместителя при атоме азота. Важное значение катехоловой группы можно продемонстрировать на примере соединений АН 3923 и АН 3365, у которых, несмотря на наличие интактной этаноламиновой группы и крупных алкильных радикалов при атоме азота, незначительные изменения в структуре катехоловой группы приводят к резкому снижению агонистической активности.

В первых работах по выявлению взаимодействия между мечеными катехоламинами и их мембранными рецепторами были использованы тритированные катехоламины с относительно низкой удельной радиоактивностью. При этом было обнаружено, что, например, $^{3}$H-изопротеренол (4 Ки/ммоль) быстро связывается мембранными препаратами. Это связывание подавляется избытком

Таблица 1

**Структура и активность соединений, стимулирующих аденилатциклазу**

| Соединение | Катехол | | Этаноламин | | | Активность по отношению к активности l-изопротеренола[1] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3,4-фенол | | β-углерод | | α-углерод | |
| | (бензольное кольцо) | | —CH— | —CH— | —NH | |
| L-изопротеренол | OH | OH | OH | H | $CH(CH_3)_2$ | 1,00 |
| DL-кобефрин | OH | OH | OH | $CH_3$ | H | 0,79 |
| L-адреналин | OH | OH | OH | H | $CH_3$ | 0,89 |
| DL-этилнорадреналин | OH | OH | OH | H | $CH_2CH_3$ | 0,38 |
| АН 3923 | $CH_2OH$ | OH | OH | H | —[2] | 0,25 |
| АН 3365 | $CH_2OH$ | OH | OH | H | $C(CH_3)_3$ | 0,15 |

[1] Сравнивали активность соединений при концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М с активностью $5 \cdot 10^{-4}$ М l-изопротеренола, принятой за 1. Способ определения аденилатциклазы описан в разд. II.

[2] Метоксифенилизопропиловая группа.

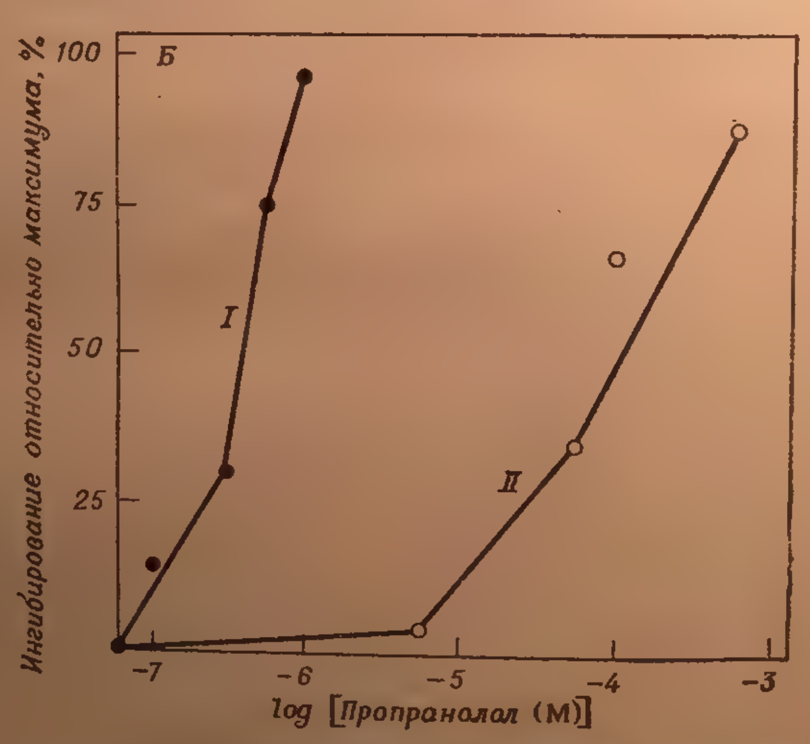



Рис. 2. *А*. Активация аденилатциклазы под действием возрастающих концентраций l- и d-изопротеренола (*I* и *II* соответственно). *Б*. Ингибирование аденилатциклазной активности (концентрация l-изопротеренола $5 \cdot 10^{-5}$ М) возрастающими концентрациями l- и d-пропранолола (*I* и *II*). Метод определения аденилатциклазы описан в разд. II.

Таблица 2

**Связь между структурой аналогов катехоламинов и их способностью активировать аденилатциклазу и конкурировать за места, связывающие катехоламины**

| Группа | Соединение | Структурные детерминанты | | | Активность[1] | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | катехол | этаноламин | | аденилатциклаза | конкуренция за связывающие участки |
| | | | OH при β-C | NH—R при α-C | | |
| А. | Изопротеренол | + | + | + | + | + |
| | Адреналин | + | + | + | + | + |
| | Норадреналин | + | + | + | + | + |
| Б. | Диоксиминдальная кислота | + | + | — | — | + |
| | Диоксифенилуксусная кислота | + | + | — | — | + |
| | Диоксифенилгликоль | + | + | — | — | + |
| В. | Дофамин | + | — | +/—[2] | — | + |
| | ДОФА | + | — | +/—[2] | — | + |
| Г. | Фенилефрин | — | +/—[2] | +/—[2] | — | — |
| | Метанефрин | — | +/—[2] | +/—[2] | — | — |
| | Ванилминдальная кислота | — | +/—[2] | +/—[2] | — | — |
| | Метокситирамин | — | +/—[2] | +/—[2] | — | — |
| | Октопамин | — | +/—[2] | +/—[2] | — | — |

[1] В тестах на агонистическую активность по влиянию на аденилатциклазу и связывание $^3$H-изопротеренола концентрация использованных соединений составляла $10^{-4}$ М.

[2] Молекулы соединений данной группы могут содержать, но могут и не содержать указанную группу.

немеченого катехоламина, причем для 50% ингибирования связывания требуется $2 \cdot 10^{-6}$—$5 \cdot 10^{-6}$ М немеченого изопротеренола (рис. 3). Примерно такая же концентрация изопротеренола вызывает полумаксимальную стимуляцию аденилатциклазы. В то же время для стимуляции транспорта натрия в целых клетках требуется значительно меньшая концентрация катехоламина (рис. 1).

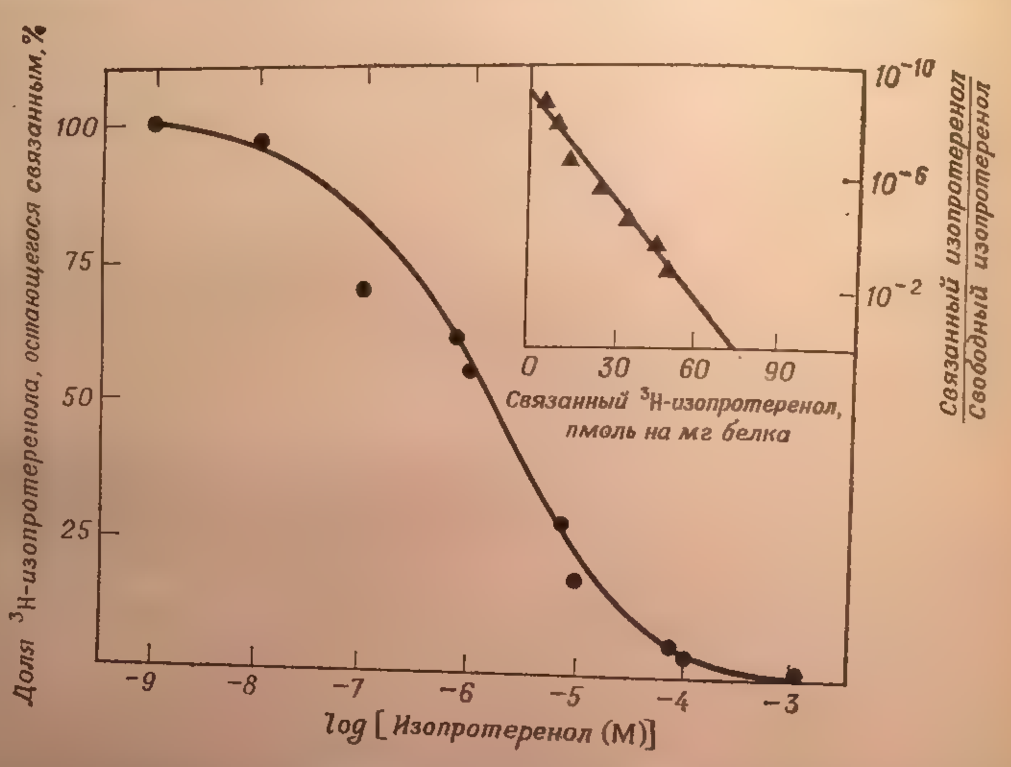



**Рис. 3.** Связывание тритированного DL-изопротеренола как функция концентрации немеченого DL-изопротеренола. Вставка: данные, приведенные на рис. 3, представлены в координатах Скэтчарда. Условия эксперимента описаны в разд. II [11] (с разрешения Американского общества биохимиков).

Для того чтобы катехоламин мог оказывать стимулирующее действие на аденилатциклазу, его структура должна отвечать ряду весьма жестких требований (табл. 2, группа А). В то же время для связывания гормона плазматическими мембранами необходимо лишь наличие интактной катехоловой функции (табл. 2, группы А, Б, В). Так, соединения, содержащие катехоловую группу, но не отвечающие другим условиям, необходимым для проявления стимулирующего влияния на аденилатциклазу, были тем не менее способны эффективно конкурировать за связывающие места (табл. 2, группы Б и В). Аналоги катехоламинов, лишенные катехолового радикала (табл. 2, группа Г), несмотря на наличие β-гидроксильной или аминной группы, не влияли ни на активность аденилатциклазы, ни на связывание меченого изопротеренола.

## Б. Структурная специфичность β-адренергического ингибирования

Сильные ингибиторы аденилатциклазы вызывают полумаксимальное ингибирование фермента, если соотношение концентраций антагониста и агониста не превышает 0,10. Этаноламиновая функция β-блокаторов подобна этаноламиновой функции изопротеренола (табл. 1). Для проявления агонистической активности решающее значение имеет катехоловая группа. В то же время β-антагонистической активностью обладают соединения с весьма широким спектром ароматических функций (табл. 3, графа А), с замещенными нафтиловой, фенильной или индоильной группами. Замена нафтиловой функции пропанолола на другие ароматические груп-

*Таблица 3*

**Сильные ингибиторы стимулируемой изопротеренолом аденилатциклазной активности** [1]

| Соединение | Ароматическая функция (А) | Метоксильный мостик (Б) | Этаноламин |
|---|---|---|---|
| Пропранолол | | + | + |
| Оксибензилпиндолол | N | + | + |
| Окспренелол | $OCH_2CH{=}CH_2$ | + | + |
| Индоилметоксиэтаноламин | N | + | + |
| Бунолол | O | + | + |
| Йодофенилметоксиэтаноламин | I | + | + |
| Алпренелол | $CH_2CH{=}CH_2$ | + | + |
| Оксипропранолол | OH | + | + |

[1] Полумаксимальное ингибирование чувствительной к катехоламинам аденилатциклазы при концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М достигается при соотношении концентраций антагониста (в табл. антагонисты расположены в порядке их эффективности) и агониста, не превышающем 0,1.

пы несколько снижает β-ингибирующую эффективность данного соединения. Для всех сильных ингибиторов характерно наличие метоксигруппы, соединяющей ароматическую и этаноламиновую функции (табл. 3, графа Б). Введение заместителей в положение 2 фенильной группы (окспренолол, иодофенилметоксиэтаноламин, алпренелол) не оказывает сколько-нибудь значительного влияния на ингибиторную активность.

*Таблица 4*

**β-Адренергические ингибиторы со средней и слабой активностью [1]**

| Соединение | Ароматическая функция (А) | Метоксильный мостик (Б) | Этаноламин |
|---|---|---|---|
| | *Соединения со средней активностью* | | |
| Дихлоризопротеренол | Cl, Cl | — | + |
| Нилидрин | OH | — | + |
| Пронетелол | | — | + |
| | *Соединения со слабой активностью* | | |
| Оксифенилметоксиэтаноламин | OH | + | + |
| Соталол | $NH(SO_2)CH_3$ | — | + |
| Аминофенилметоксиэтаноламин | $NH_2$ | + | + |
| Практолол | $NHCOCH_3$ | + | + |

[1] Полумаксимальное ингибирование аденилатциклазной активности при концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М достигается при соотношении концентраций антагониста и агониста, не превышающем 1 для соединений со средней активностью и 20 для соединений со слабой активностью.

У ингибиторов средней активности (табл. 4) метоксигруппа, наличие которой характерно для сильных β-ингибиторов, отсутствует. Полумаксимальное ингибирование для этого типа β-блокаторов достигается при соотношении концентраций антагониста и агониста около 1,0. Для соединений данной группы характерны ва-

риабельность ароматической функции и сходство этаноламиновой группы. Изъятие из молекулы метоксильного мостика приводит к снижению активности соединения, несмотря на сохранение всех остальных особенностей его структуры (например, пронетелол и пропранолол).

Для полумаксимального ингибирования аденилатциклазной активности слабыми β-адренергическими ингибиторами (табл. 4) соотношение концентраций антагониста и агониста должно приближаться к 20. В данной группе соединений наличие метоксильного мостика уже не является решающим и единственным фактором, определяющим эффективность соединения (табл. 4). Все соединения этой группы содержат заместитель в *пара*-положении фенильного кольца. Таким образом, при наличии *пара*-замещенных фенильных производных присутствие метоксильного мостика не оказывает заметного влияния на ингибиторную активность.

Широкий диапазон эффективности различных соединений в ингибировании активности аденилатциклазы не находит своего отражения в экспериментах по подавлению этими антагонистами связывания $^3H$-изопротеренола плазматическими мембранами. Действительно, и сильный ингибитор l-(—)-пропранолол, и слабый ингибитор соталол — оба одинаково плохо конкурируют с тритированным изопротеренолом за связывающие места (данные не представлены). Вообще для β-адренергических ингибиторов независимо от их эффективности в действии на аденилатциклазу характерна слабая конкуренция с $^3H$-катехоламином.

## В. Стереоспецифичность активации и ингибирования

Эффекты активации и ингибирования активности аденилатциклазы под действием соответственно изопротеренола и пропранолола характерны для l-(—)-изомеров этих соединений. Активность d-(+)-изомеров составляет менее 1% активности l-(—)-изомеров и в отношении активации, и в отношении ингибирования. В то же время в случае катехол-специфического связывания такая стереоспецифичность не проявляется: с плазматическими мембранами одинаково хорошо взаимодействовали и l-(—)- и d-(+)-катехоламины (рис. 4). Слабый агонист d-(+)-изопротеренол ингибировал связывание $^3H$-изопротеренола (рис. 4); в то же время сильный антагонист l-(—)-пропранолол оказывал очень слабое ингибиторное действие на связывание. Слабый антагонист d-(—)-пропранолол также слабо подавлял связывание. Таким образом, стереоспецифичность, являющаяся решающим фактором в активирующем или ингибирующем влиянии катехоламинов на активность чувствительной аденилатциклазы, не находит своего отражения в экспериментах по взаимодействию тритированных катехоламинов со связывающими местами плазматических мембран эритроцитов индейки.

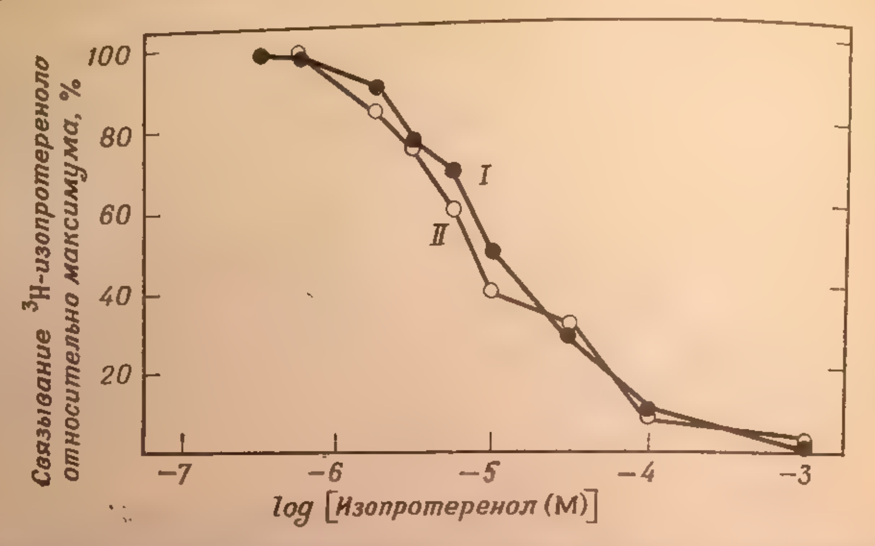



**Рис. 4.** Отсутствие стереоспецифичности в связывании тритированного DL-изопротеренола. Для подавления связывания тритированного DL-изопротеренола использовали возрастающие концентрации немеченого l- и d-изопротеренола (I и II соответственно).

## Г. Стереоспецифические связывающие места

Проверка гипотезы о существовании стереоспецифических связывающих мест β-рецепторов стала возможной после того, как Аурбах и др. [18] успешно синтезировали сильный β-адренергический ингибитор, который можно было легко иодировать. Подобно другим β-ингибиторам, данное соединение (оксибензилпиндолол) лишено катехоловой функции. Поэтому при изучении связывания с помощью этого соединения отпадает необходимость учитывать катехол-специфические участки связывания. Кроме того, высокая удельная радиоактивность иодированного производного (400 Ки/

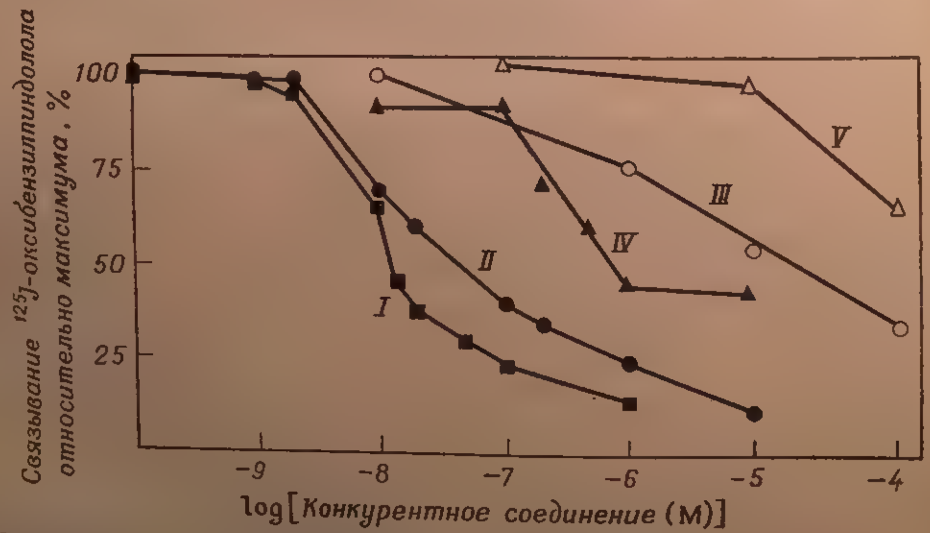



**Рис. 5.** Стереоспецифическое связывание $^{125}$I-оксибензилпиндолола. Для подавления связывания иодированного оксибензилпиндолола использовали возрастающие концентрации немеченого оксибензилпиндолола (*I*), l- и d-пропранолола (*II* и *III*), l- и d-изопротеренола (*IV* и *V*).

23—882

Таблица 5

**Способность β-антагонистов ингибировать активность аденилатциклазы и связывание иодированного оксибензилпиндолола и тритированного изопротеренола**

| Соединение | Относительное ингибирование аденилатциклазы (ингибиторная активность пропранолола принята равной 1) | Относительное ингибирование связывания $^{125}$I-оксибензилпиндолола (ингибиторная активность пропранолола принята равной 1)[1] | Относительное ингибирование связывания $^{3}$H-изопротеренола (ингибиторная активность изопротеренола принята равной 1)[2] |
|---|---|---|---|
| l-(—)-Пропранолол | 1,00 | 1,00 | <0,01 |
| Оксибензилпиндолол | 2,00 | 2,00 | <0,01 |
| Окспренелол | 0,56 | 0,75 | <0,01 |
| Дихлоризопротеренол | 0,30 | 0,02 | <0,01 |
| Нилидрин | 0,02 | 0,02 | <0,01 |
| Соталол | <0,01 | <0,01 | <0,01 |

[1] Величины получены путем сопоставления $K_i$ для данного соединения и для пропранолола.

[2] Величины получены путем сопоставления $K_i$ для данного соединения и для изопротеренола.

/ммоль) дает возможность выявлять связывающие участки с высоким сродством. Связывание иодированного оксибензилпиндолола плазматическими мембранами при 4° С достигает равновесия в пределах 60 мин. Избыток немеченого оксибензилпиндолола ингибирует связывание меченого соединения. Полумаксимальное ингибирование связывания наблюдается при концентрации аналога $1\cdot10^{-8}$—$2\cdot10^{-8}$ М (рис. 5). Способность других β-антагонистов подавлять связывание коррелирует с их ингибиторной активностью относительно аденилатциклазы (табл. 5). Агонист l-(—)-изопротеренол также ингибирует связывание, но его активность в этом отношении составляет лишь 2% активности l-(—)-пропранолола (рис. 5). Таким образом, пропранолол обладает большим сродством к данному типу связывающих мест, чем l-(—)-изопротеренол. Это различие в сродстве коррелирует с большей по сравнению с изопротеренолом активностью пропранолола в отношении аденилатциклазной системы. d-(+)-Изопротеренол также ингибирует связывание, но ингибирующая активность составляет лишь 1% соответствующей активности l-(—)-изопротеренола, что хорошо коррелирует со слабой агонистической активностью d-(+)-изомера.

Все соединения, способные взаимодействовать с выявляемыми с помощью иодированного оксибензилпиндолола связывающими местами, являются либо β-агонистами, либо β-антагонистами. Катехоловые соединения (ДОФА, диоксиминдальная кислота) и этаноламины (метанефрин, октопамин), не являющиеся агонистами, не взаимодействуют в сколько-нибудь значительной степени с данным типом связывающих мест. Наиболее существенные свойства связывающих мест, обнаруживаемых с помощью тритированного изопротеренола и иодированного оксибензилпиндолола, сведены в табл. 6.

*Таблица 6*

**Характеристики мест связывания тритированного изопротеренола и иодированного оксибензилпиндолола**

| Свойство | Тритированный изопротеренол | Иодированный оксибензилпиндолол |
|---|---|---|
| Структурная специфичность | Катехоловая группа | Структура β-агонистов и β-антагонистов |
| Число связывающих мест | Много | Мало |
| Константа диссоциации | $2\cdot10^{-6}$ М | $<10^{-10}$ М[1] |
| Стереоспецифичность | Отсутствует | Имеется |
| Сродство к местам связывания коррелирует с агонистической активностью | Нет | Да |
| Сродство к местам связывания коррелирует с антагонистической активностью | » | » |

[1] Определяли по методу Скэтчарда.

## Д. Усиление чувствительной к катехоламинам аденилатциклазы и связывание с местами, регулируемыми гуаниловыми нуклеотидами

Ранее мы обнаружили, что гуанозинтрифосфат (ГТФ) повышает активность стимулируемой изопротеренолом аденилатциклазы эритроцитов индейки (рис. 6). Этот эффект опосредуется тем же β-адренергическим механизмом, с помощью которого пропранолол ингибирует повышенную активность аденилатциклазы. При-

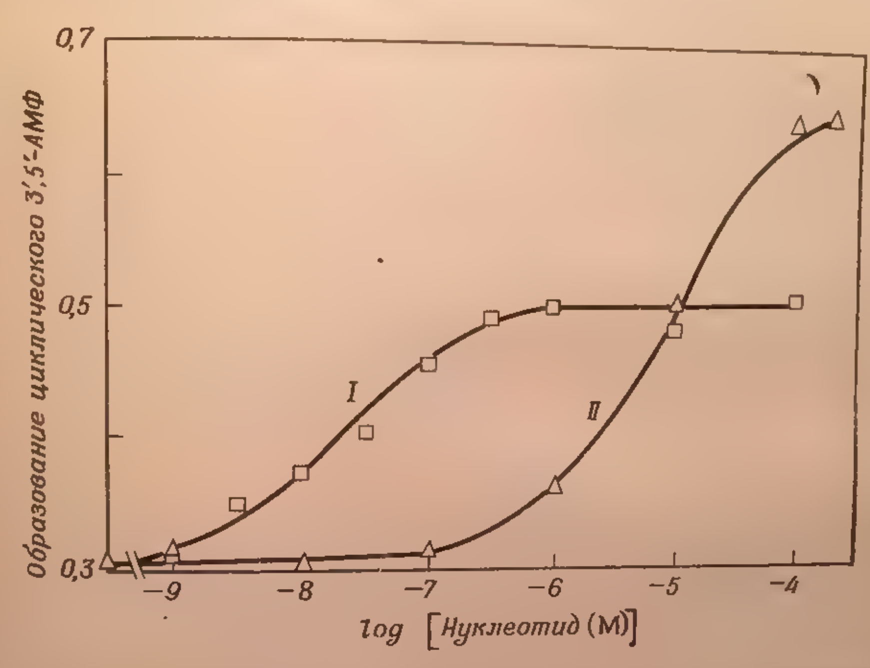



Рис. 6. Усиление активности индуцированной катехоламином аденилатциклазы под действием ГТФ и ИТФ [26]. В реакционную смесь, содержащую изопротеренол ($5 \cdot 10^{-5}$ М), добавляли возрастающие концентрации ГТФ (*I*) или ИТФ (*II*). Каждая точка представляет собой среднее из 3 определений. Метод определения описан в разд. II. По оси ординат отложено количество (нмоль) циклического 3'5'-АМФ, образованного в расчете на 1 мг белка за 10 мин. (С разрешения Американского общества биохимиков.)

рост активности фермента под действием ГТФ равняется той доле активности аденилатциклазы, которая может быть снята пропранололом в отсутствие ГТФ (рис. 7). Стимулирующий эффект более выражен при использовании негидролизируемого соединения гуанилилимидодифосфата (Гфф(NH)ф), который существенно увеличивает как базальную, так и чувствительную к изопротеренолу активность аденилатциклазы. Активность фермента, обнаруживаемая при наличии одновременно Гфф(NH)ф и изопротеренола, превышает активность, выявляемую в присутствии только одного фторида, и в 10—20 раз превышает активность, наблюдаемую в присутствии одного изопротеренола. При наличии гуанилилимидодифосфата происходит также превращение дофамина (не обладающего агонистической активностью) и добутамина (слабого аго-

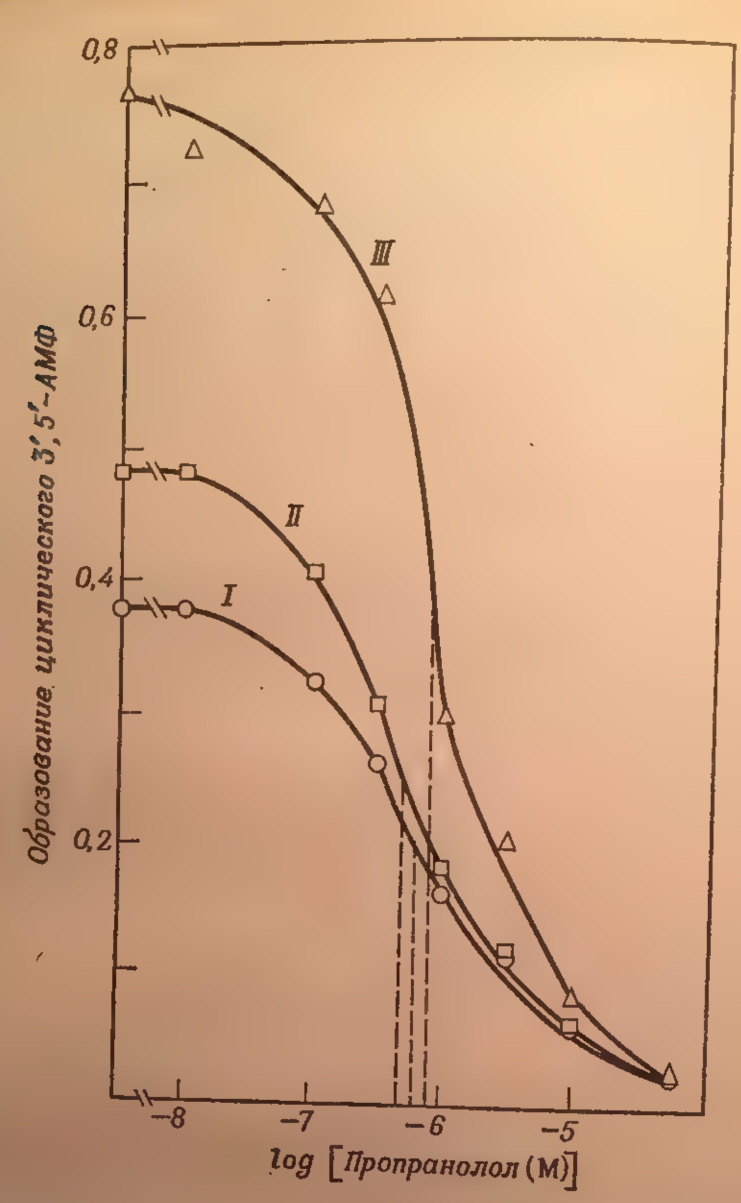



**Рис. 7.** Влияние нуклеотидов на чувствительность стимулированной изопротеренолом аденилатциклазы к пропранололу [26]. Влияние изопротеренола (5×10⁻⁵ М) на аденилатциклазу определяли в отсутствие (*I*) или в присутствии 0,2 мМ ГТФ (*II*) или ИТФ (*III*) при увеличивающихся концентрациях пропранолола. По оси ординат отложено количество (нмоль) циклического 3′5′-АМФ, образованного в расчете на 1 мг за 10 мин. (С разрешения Американского общества биохимиков.)

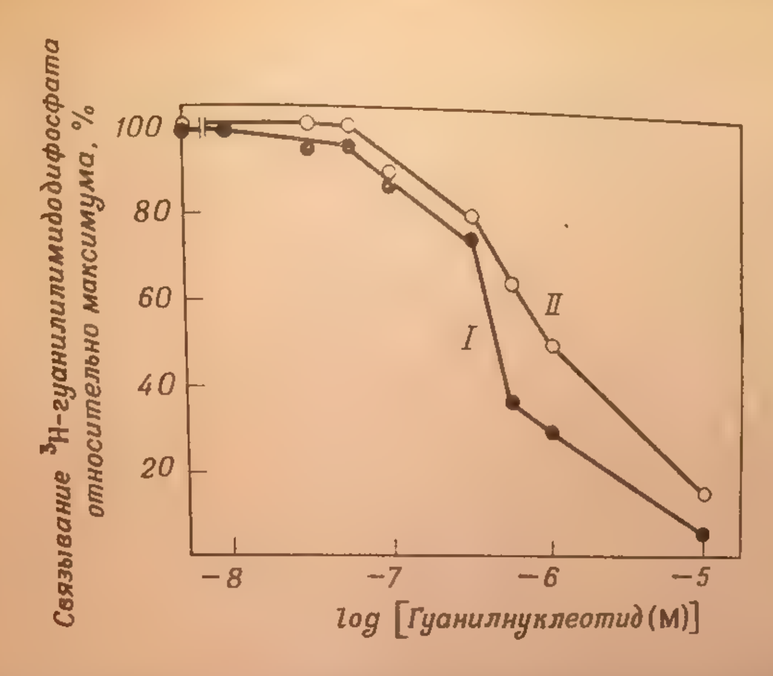



**Рис. 8.** Действие гуаниловых нуклеотидов на связывание $^3$Н-гуанилилимидодифосфата плазматическими мембранами эритроцитов индейки. Пробы содержали тритированный гуанилилимидодифосфат и возрастающие концентрации немеченого гуанилилимидодифосфата (*I*) или ГТФ (*II*).

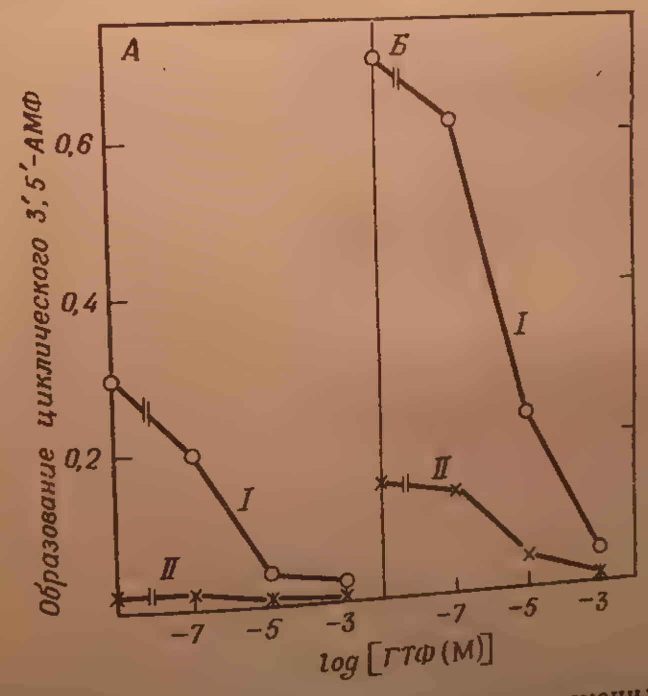



Рис. 9. *А*. Влияние ГТФ на усиленную под действием гуанилилимидодифосфата активность аденилатциклазы. Определение аденилатциклазной активности проводили в присутствии гуанилилимидодифосфата ($10^{-7}$ *М*) и в присутствии (*I*) или в отсутствие (*II*) изопротеренола и возрастающих концентраций ГТФ. *Б*. Условия те же, что и на рис. 9, *А*, но концентрация гуанилилимидодифосфата составляла $10^{-5}$ М. По оси ординат отложено количество (нмоль) циклического 3′5′-АМФ, образованного на 1 мг белка за 10 мин.

*Таблица 7*

**Влияние гуанилилимидодифосфата на активность аденилатциклазы**[1]

| | Контроль | Пропранолол | Гфф(NH)ф | Гфф(NH)ф+Пропранолол |
|---|---|---|---|---|
| Контроль | 3,08 | 3,32 | 25,5 | 21,3 |
| Изопротеренол | 30,3 | 5,70 | 223 | 65,2 |
| Дофамин | 5,51 | 6,63 | 59,3 | 11,6 |
| Добутамин | 8,13 | 2,00 | 119 | 13,8 |

[1] Определение аденилатциклазной активности проводили в присутствии указанных комбинаций β-агонистов, антагонистов и Гфф(NH)ф. Представлены средние величины (в пмолях на 1 мг белка за 10 мин) из трех определений. Концентрация всех соединений равнялась $10^{-4}$ М. Метод определения аденилатциклазы описан в разд. II.

ниста) в агонисты, активность которых подавляется пропранололом (табл. 7).

Стимулирующее действие Гфф(NH)ф на активность чувствительной к катехоламинам аденилатциклазы также может быть подавлено пропранололом (табл. 7). Однако, хотя Гфф(NH)ф увеличивает активность индуцированной β-агонистами аденилатциклазы, его присутствие не сказывается на связывании катехоламина, меченного тритием. Но, с другой стороны, $^3$H-Гфф(NH)ф взаимодействует со специфическими для него связывающими местами плазматических мембран эритроцитов индейки. Это связывание подавляется самим немеченым Гфф(NH)ф и ГТФ (рис. 8). Конкуренция между ГТФ и Гфф(NH)ф за связывание одними и теми же регуляторными участками доказана экспериментально (рис. 9): ГТФ подавляет индуцируемое Гфф(NH)ф повышение активности аденилатциклазы как в присутствии, так и в отсутствие изопротеренола.

## IV. ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты рассмотренных исследований позволяют глубже понять механизмы, с помощью которых β-адренергические катехоламины оказывают влияние на функционирование клетки. Как впервые было замечено Сазерлендом и др. [3, 4], имеющие ядра эритроциты индейки содержат активную аденилатциклазу, чувствительную к катехоламинам. Физиологическая роль этой системы, по данным более ранних исследований [15—17], может заключаться в регуляции ионных потоков через эритроцитарную мембрану. Недавно Гарднер и др. [31—33] получили новые данные об участии цАМФ в регуляции транспорта ионов: было обнаружено, что аденилатциклаза эритроцитов индейки влияет и на поток калия.

Изучение связи между структурой катехоламинов и их функци-

ей показало, что для действия на аденилатциклазу эритроцитов индейки необходимыми условиями являются наличие катехоловой группы, стереоспецифической β-гидроксильной группы и первичной или вторичной аминогруппы при α-углеродном атоме. Хотя определенной агонистической активностью обладают, как было обнаружено в данном исследовании и в других работах, и некоторые соединения, не содержащие катехоловую группу [34, 35], важность этой группы для проявления агонистической активности является, видимо, общим правилом. Наряду с катехоловой группой в соединении должна присутствовать β-гидроксильная группа. Так, хотя дофамин и является катехоламином, способным стимулировать аденилатциклазу в других системах [36—40], он лишен β-гидроксила и поэтому не стимулирует эритроцитарную аденилатциклазу.

Для проявления ингибиторного влияния на β-адренергические функции соединение должно обладать структурными особенностями, отличными от тех, которые необходимы для β-адренергической активации. Относительно постоянную катехоловую группу агонистов у β-адренергических ингибиторов заменяет широкий спектр ароматических соединений. Общими для агонистов и антагонистов особенностями являются наличие этаноламиновой или аналогичной группы и стереоспецифичность по отношению к l-(—)-изомерам.

Можно было ожидать, что во взаимодействии между катехоламинами, β-адренергическими ингибиторами и их рецепторами должны найти свое отражение перечисленные выше структурные требования, необходимые для проявления активирующего и ингибиторного влияния на аденилатциклазу. Ряд исследователей пытались выяснить этот вопрос, используя тритированные катехоламины [7—14, 41—43]. Для связывания меченных тритием катехоламинов препаратами плазматических мембран различного происхождения характерна, как было обнаружено, химическая специфичность: избыток немеченых катехоламинов препятствует связыванию меченого соединения [7—14, 41—43]. Эта специфичность, однако, определяется лишь катехоловым радикалом молекулы. Таким образом, структурные требования, которым должны отвечать соединения, чтобы действовать на активность аденилатциклазы и на связывание тритированных катехоламинов, существенно различаются. Для связывания $^3H$-изопротеренола к тому же не характерна стереоспецифичность [11, 13, 14]. Более того, пропранолол, который обладает высокой ингибиторной активностью по отношению к чувствительной к катехоламинам аденилатциклазе, является очень слабым ингибитором связывания [11]. Эти даннные совпадают с результатами исследований, проведенных в других лабораториях [7—10, 13, 14, 41—43]. Таким образом, β-рецепторы обладают свойствами, которые не могут быть непосредственно выявлены с помощью тритированных катехоламинов. Обнаруживаемые связывающие места с относительно низким сродством и высокой

емкостью, специфичные к катехоловой части молекулы катехоламина, вероятно, маскируют предполагаемые стереоспецифические места связывания, которых, как можно думать, должно быть меньше и которые обладают бо́льшим сродством к β-активным агентам [11]. Кроме того, имеющиеся соединения с тритием в качестве метки обладают удельной радиоактивностью, недостаточной для надежного выявления участков связывания с высоким сродством. В связи с этим Аурбах и др. [18] синтезировали β-адренергический ингибитор оксибензилпиндолол, который может быть легко иодирован до высокой удельной радиоактивности. С помощью иодированного оксибензилпиндолола эти авторы выявили стереоспецифические связывающие места с константой диссоциации $10^{-10}$ М, значительно меньшей, чем константа диссоциации для $^{3}$H-катехоламинов [18]. Сродство β-адренергических ингибиторов к этим местам хорошо коррелирует, как впервые было показано создателями оксибензилпиндолола и подтверждено нами, с их активностью по отношению к стимулируемой катехоламинами аденилатциклазе. l-Изопротеренол также способен подавлять связывание, но его сродство составляет лишь 2% сродства пропранолола. Это различие находится в хорошем соответствии с данными о большей эффективности пропранолола в его ингибирующем действии на аденилатциклазу по сравнению со стимулирующей активностью изопротеренола. Аналоги катехоламинов, не проявляющие ни агонистической, ни антагонистической активности, не обладают и сколь-нибудь существенным сродством к связывающим местам этого типа. В разительном контрасте с данными об отсутствии стереоспецифичности у связывающих мест, специфичных для катехолов, находится наличие стереоспецифичности у мест, обнаруживаемых с помощью иодированного оксибензилпиндолола. Это свойство проявляется и в отношении антагонистов, и в отношении агонистов. Сродство изомеров к местам связывания $^{125}$I-оксибензилпиндолола хорошо соответствует эффективности этих изомеров как активаторов или ингибиторов аденилатциклазы. Таким образом, стереоспецифические связывающие места, выявленные в исследованиях с использованием иодированного оксибензилпиндолола, обладают свойствами β-адренергических рецепторов. Не исключено, что эти связывающие места и являются β-адренорецепторами. Стереоспецифические связывающие места с аналогичными свойствами были выявлены Лефковицем (см. гл. 14) с помощью другого меченого β-ингибитора — тритированного алпренолола [44].

Значение выявляемых с помощью $^{3}$H-катехоламинов мест связывания для действия катехоламинов непонятно. Кватреказас и др. [13, 14] предположили, что специфичное для катехолов связывание тритированных катехоламинов может быть результатом их взаимодействия с катехол — О-метилтрансферазой. Это предположение, однако, не подтвердилось [45].

Увеличение активности зависимой от катехоламинов аденилатциклазы под действием гуаниловых нуклеотидов первоначально было доказано в случае ГТФ [25, 26]. Впоследствии было обнаружено, что гуанилилимидодифосфат оказывает более выраженный эффект [27, 28]. Это увеличение активности чувствительной к катехоламинам аденилатциклазы в противоположность базальной активности фермента специфически подавляется 1-(—)-пропранололом. Спигель и Аурбах [28] выяснили, что Гфф(NH)ф вызывает такие изменения в кривых доза — эффект, характерных для активации ингибирования фермента, что изопретеренол становится на порядок более активным, а пропранолол — на порядок менее активным.

Показано, что гуаниловые нуклеотиды прямо и специфически взаимодействуют с плазматическими мембранами эритроцитов индейки, причем Гфф(NH)ф и ГТФ связываются одинаково хорошо. Это позволяет думать, что действие обоих соединений на аденилатциклазу включает их взаимодействие с одними и теми же местами связывания. Гораздо более слабое действие ГТФ на аденилатциклазу может быть результатом его гидролиза фосфатазой, связанной с мембранами [28]. Однако непонятно, почему же ГТФ, оказывающийся более чувствительным к ферментативному гидролизу, чем Гфф(NH)ф, при действии на аденилатциклазу, обладает в то же время таким же сродством к нуклеотидсвязывающим местам, как и Гфф(NH)ф.

Заслуживает внимания также и тот факт, что такие катехоламины, как дофамин и добутамин, которые не обладают сколько-нибудь выраженной агонистической активностью в данной системе, в присутствии Гфф(NH)ф становятся β-агонистами. В интересной работе Шрамма и Родбелла [46] обнаружено, что если эритроциты лягушки инкубировать одновременно с изопротеренолом и Гфф(NH)ф (но не по отдельности), то активируемую аденилатциклазу впоследствии не удается подавить пропранололом. Таким образом, гуаниловые нуклеотиды повышают чувствительность β-адренергической аденилатциклазной системы к β-агонистам, вызывают появление чувствительности к дофамину и добутамину, при некоторых условиях обеспечивают постояннно высокую активность фермента. Причина такого действия гуаниловых нуклеотидов пока еще не установлена, и для ее выяснения потребуются дальнейшие исследования. Кажется, однако, вероятным, что между β-рецепторным механизмом и механизмом связывания нуклеотидов существует взаимозависимость, ведущая в конечном счете к конвергенции эффектов на аденилатциклазную систему.

## Благодарность

Это исследование частично финансировалось Государственной службой здравоохранения США (AM 09579, HL 17813-01), ассоциацией производителей фармакологических препаратов и вспо-

могательным фондом Нью-йоркской кардиологической ассоциации.

Я хотел бы поблагодарить д-ра Г. Д. Аурбаха и д-ра Рональда Таттла за предоставленные ими оксибензилпиндолол и добутамин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sutherland E. W., Robison G. A., Butcher R W.*, Circulation, *37*, 279 (1968).
2. *Robison G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W.*, in: Biochemical Actions of Hormones (G. Litwak, ed.), Academic Press, New York, 1972, pp. 81—111.
3. *Davoren P. R., Sutherland E. W.*, J. Biol. Chem. *283*, 3009 (1963).
4. *Oye I., Sutherland E. W.*, Biochem. Biophys. Acta, *127*, 347 (1966).
5. *Shaw J., Gibson W., Jessup S., Ramwell P.*, Ann. NY Acad. Sci., *180*, 141 (1971).
6. *Rosen O. R., Rosen S. M.*, Arch. Biochem. Biophys., *131*, 449 (1969).
7. *Tomasi V., Koretz S., Ray T. K., Dunnick J., Marinetti G. V.*, Biochim. Biophys. Acta, *211*, 31 (1970).
8. *Dunnick J. K., Marinetti G. V.*, Biochim. Biophys. Acta, *249*, 122 (1971).
9. *Schramm M., Feinstein N. E. M., Lasser M.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 523 (1972).
10. *Lefkowitz R. J., Sharp G. W. G., Haber E.*, J. Biol. Chem., *248*, 342 (1973).
11. *Bilezikian J. P., Aurbach G. D.*, J. Biol. Chem., *248*, 5575 (1973).
12. *Bilezikian J. P., Aurbach G. D.*, J. Biol. Chem., *248*, 5584 (1973).
13. *Cuatrecasas P., Tell G. P. E., Sica V., Parikh I., Chang K.*, Nature, *247*, 92 (1974).
14. *Tell G. P. E., Cuatrecasas P.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *57*, 793 (1974).
15. *Gardner J. D., Klaeveman H. L., Bilezikian J. P., Aurbach G. D.*, J. Biol. Chem., *248*, 5590 (1973).
16. *Gardner J. D., Klaeveman H. L., Bilezikian J. P., Aurbach G. D.*, J. Biol. Chem., *249*, 516 (1974).
17. *Gardner J. D., Klaeveman H. L., Bilezikian J. P., Aurbach G. D.*, Endocrinology, *95*, 499 (1974).
18. *Aurbach G. D., Fedak S. A., Woodard C. J., Palmer J. S., Hauser D., Troxler F.*, Science, *180*, 1223 (1974).
19. *Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S. L., Krans H. M. J.*, J. Biol. Chem., *246*, 1877 (1971).
20. *Harwood J. P., Low H., Radbell M.*, J. Biol. Chem., *248*, 6239 (1973).
21. *Goldfine I. D., Roth J., Birnbaumer L.*, J. Biol. Chem., *247*, 1211 (1972).
22. *Wolff J., Cook G. H.*, J. Biol. Chem., *248*, 350 (1973).
23. *Bockaert J., Roy C., Jard S.*, J. Biol. Chem., *247*, 7073 (1972).
24. *Kuo W., Hodgkin D. S., Kuo K. F.*, J. Biol. Chem., *248*, 2705 (1973).
25. *Levay F., Chamboult A., Hanoune J.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *48*, 1385 (1972).
26. *Bilezikian J. P., Aurbach G. D.*, J. Biol. Chem., *249*, 157 (1974).
27. *Lefkowitz R. J.*, J. Biol. Chem., *249*, 6119 (1974).
28. *Spiegel A. M., Aurbach G. D.*, J. Biol. Chem., *249*, 7630 (1974).
29. *Saloman Y., Landos C., Rodbell M.*, Anal. Biochem., *58*, 541 (1974).
30. *Hunter W. M., Greenwood F. C.*, Nature, *194*, 495 (1962).
31. *Gardner J. D., Mensh R. S., Kiino D. R., Aurbach G. D.*, J. Biol. Chem., *250*, 1155 (1975).
32. *Gardner J. D., Kiino D. R., Tow N,. Aurbach G. D.*, J. Biol. Chem., *250*, 1164 (1975).
33. *Gardner J. D., Low N., Kiino D. R.*, J. Biol., Chem., *250*, 1176 (1975).
34. *Rosen O. M., Erlichman J, Rosen S. M.*, Mol. Pharmacol., *6*, 524 (1970).
35. *Grunfeld C., Grollman A. P., Rosen O. M.*, Mol. Pharmacol., *10*, 605 (1974).
36. *Brown J. H., Makman M. H.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 539 (1972).

37. *Kebabian J. W., Greengard P.*, Science, *174*, 1346 (1971).
38. *Kebabian J. W., Petzold G. L., Greengard P.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 2145 (1972).
39. *Sheppard H., Burghardt C. R.*, Mol. Pharmacol., *7*, 7 (1971).
40. *Sheppard H., Burghardt C. R.*, Mol. Pharmacol., *10*, 721 (1974).
41. *Lefkowitz R. J., Haber E.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *68*, 1773 (1971).
42. *Lefkowitz R. J., O'Hara D., Warshaw J. B.*, Biochim. Biophys. Acta, *332*, 317 (1974).
43. *Ochoa E., DeCarlin M. C. L., De Robertis E.*, Eur. J. Pharmacol., *18*, 367 (1972).
44. *Lefkowitz R. J., Mukherjee C., Coverstone M., Caron M.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *60*, 703 (1974).
45. *Lefkowitz R. J.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *58*, 1110 (1974).
46. *Schramm M., Rodbell M.*, J. Biol. Chem., *250*, 2232 (1974).

Глава 16

# ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЦЕПТОРОВ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

*М. СЁРКС И ДЖ. ОППЕНГЕЙМЕР*

Division of Endocrinology, Department of Medicine
Montefiore Hospital and Medical Center and
The Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York

## I. ВВЕДЕНИЕ

Способность гормонов щитовидной железы влиять на огромное количество метаболических процессов известна уже давно; однако элементы гипотезы о механизме действия этих гормонов, объединяющей все эти данные, начали обрисовываться лишь в последнее время. Такая гипотеза должна объяснить широкий спектр гормональных эффектов в различных тканях представителей и млекопитающих, и амфибий. В ней, например, должны найти отражение такие факты, как выраженное влияние гормонов щитовидной железы на дифференцировку тканей (о чем можно судить по метаморфозу головастиков), на созревание тканей (например, развитие мозга) и на поддержание нормального обмена веществ у взрослого животного. Отсутствие гормонов щитовидной железы в таких биологических системах приводит соответственно к нарушению метаморфоза, к неполному созреванию мозга, проявляющемуся в форме выраженного слабоумия (кретинизм), и к синдрому микседемы у взрослых. За многие годы был предложен ряд теорий для объяснения различных биологических эффектов гормонов щитовидной железы; недавно вышла сводка наиболее существенных предположений на этот счет [1].

В настоящее время наиболее убедительно обосновано предположение, что биологическое действие гормонов щитовидной железы осуществляется путем регуляции белкового синтеза. Это положение выдвинул Тата [2], обнаруживший, что при введении крысам гормона щитовидной железы его биологические эффекты можно заблокировать одновременным введением метаболических ингибиторов белкового синтеза. Впоследствии Тата и Уиднелл [3] показали, что наиболее ранние эффекты гормона щитовидной железы связаны с синтезом новой РНК. Так, в течение нескольких часов после введения L-трииодтиронина ($T_3$) эти авторы наблюдали увеличение количества быстрометящейся ядерной РНК и по-

вышение активности ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Обнаруженные эффекты предшествовали усилению микросомного синтеза белка и увеличению поглощения кислорода отдельными тканями и организмом в целом [4].

Эти работы привлекли внимание исследователей к клеточному ядру как первичному месту действия гормонов щитовидной железы. Однако в первых экспериментах [5—8], проведенных in vivo и in vitro, специфического взаимодействия этих гормонов с ядром клетки обнаружено не было. На протяжении последних лет специфические рецепторы иодтиронинов в клеточных ядрах все же были найдены, и некоторые их свойства теперь изучены. Работы, связанные с выявлением ядерных рецепторов и изучением их физиологического значения, отражены в недавно вышедшем обзоре [1], а здесь мы их кратко суммируем. В настоящей главе будут рассмотрены главным образом данные, касающиеся природы ядерных рецепторов.

## II. ВЫЯВЛЕНИЕ РЕЦЕПТОРОВ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

О существовании связывающих мест с ограниченной емкостью в ядрах клеток печени и почек крыс впервые сообщили Оппенгеймер и др. в 1972 г. [9]. Эти места были выявлены путем измерения количества $^{125}I\text{-}T_3$ в ядрах через 30 мин после внутривенного введения следовых количеств $^{125}I\text{-}T_3$ и возрастающих количеств немеченого гормона. При этом было обнаружено, что концентрация $^{125}I\text{-}T_3$ в очищенных ядрах была максимальной при введении животным лишь следовых количеств $^{125}I\text{-}T_3$; при увеличении дозы немеченого гормона количество $^{125}I\text{-}T_3$ в ядрах снижалось. Эти эксперименты ясно показали, что в ядрах имеются связывающие места для $T_3$ с ограниченной емкостью. Последующие исследования были выполнены для того, чтобы выяснить, действительно ли эти участки представляют собой клеточные рецепторы гормонов щитовидной железы. Сначала было установлено, что $T_3$, связанный ядерными участками печени, легко обменивается с $T_3$ клеточного цитозоля и плазмы [10]. Это наблюдение позволило измерить связывающую емкость и кажущуюся равновесную константу ассоциации связывающих участков печени и других тканей [10, 11]. Сравнение результатов определения связывания $T_3$ и L-тироксина ($T_4$) ядерными участками показало, что эти участки более специфичны в отношении $T_3$; об этот свидетельствуют данные о количестве связываемого $^{125}I\text{-}T_4$, а также тот факт, что связанный ядрами $^{125}I\text{-}T_4$ вытеснялся в меньшей степени, чем $T_3$ [10]. Эти наблюдения находятся в соответствии с недавно установленным фактом, что основная часть биологических эффектов гормонов щитовидной железы приходится на долю $T_3$ [12—15а]. Конкурентный анализ других аналогов $T_3$ показал, что с учетом различий в распределении и метаболизме этих аналогов сродство к ядерным участ-

кам хорошо коррелирует с агонистической активностью этих соединений [16]. У крыс ядерные связывающие места были обнаружены во всех исследованных тканях [11], однако их концентрация в различных тканях сильно различалась. Концентрация ядерных связывающих мест в тканях, которые принято считать нечувствительными к гормонам щитовидной железы, например в семенниках и селезенке, оказалась намного ниже, чем в таких чувствительных к гормонам тканях, как передняя доля гипофиза, печень и сердце. Конечная емкость ядерных участков, по-видимому, обусловливает ограничение биологического ответа ткани на введенный гормон [17]. Максимальный биологический эффект развивался тогда, когда ядерные места были полностью насыщены гормоном. Даже большой избыток гормона над тем его количеством, которое необходимо для насыщения связывающих мест, не вызывал дальнейшего усиления биологического эффекта. Таким образом, различные группы фактов свидетельствовали об одном: места связывания гормонов щитовидной железы в ядрах действительно являются рецепторами этих гормонов.

Перечисленные свойства мест, связывающих иодтиронины, в ядрах печени интактных крыс были подтверждены в работе Де-Гроота и Строссера [18]. Сэмюэлс и Цай [19] представили новые данные о рецепторной функции ядерных мест, обладающих ограниченной емкостью для гормонов щитовидной железы. Эти авторы обнаружили аналогичные связывающие места в культуре гипофизарных клеток $GH_1$. Клетки этой культуры явно чувствительны к гормонам щитовидной железы, о чем свидетельствует ускорение их роста и увеличение окисления глюкозы [20], ингибирование секреции пролактина и стимуляции секреции гормона роста [21] под действием гормонов щитовидной железы. Но самое главное заключается в том, что концентрация гормона, необходимая для проявления его полумаксимального биологического действия на эти параметры, очень близка к кажущейся равновесной константе диссоциации для взаимодействия гормона с ядерными местами связывания.

## III. СВОЙСТВА РЕЦЕПТОРОВ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

### А. Локализация

Быстро накапливавшиеся данные свидетельствовали о том, что ядерные связывающие места с ограниченной емкостью и высоким сродством к гормону действительно представляют собой рецепторы гормонов щитовидной железы. Поэтому в нескольких лабораториях были начаты работы по более полному изучению природы рецепторов и их взаимодействия с гормонами щитовидной железы. Внутриядерная локализация связанного с рецепторными участками $T_3$ изучалась на изолированных ядрах печени после введения

следовых количеств $^{125}I\text{-}T_3$ [22]. Приблизительно 90% всего $^{125}I\text{-}T_3$, находящегося в ядрах, оказалось в этих условиях связанным местами с ограниченной емкостью [10]. Для удаления наружной ядерной мембраны и растворения ядерных белков выделенные ядра последовательно обрабатывали 0,2%-ным раствором тритона X-100 в 0,32 М сахарозе в присутствии 3 мМ $MgCl_2$, затем 0,14 М раствором NaCl в 10 мМ *трис*-буфере, pH 7,5 и, наконец, 100 мМ *трис*-буфером, pH 7,5. Первые две процедуры приводили к удалению из ядер по 10—20% $^{125}I\text{-}T_3$, а третья — 1,2%. Таким образом, оставшийся ядерный осадок содержал 60—75% всего количества $^{125}I\text{-}T_3$ в ядрах. Этот осадок рассматривали как грубый хроматин, так как он содержал 88% ДНК, 65% белка и 50% РНК ядер. Возможность того, что выявленный тип локализации мест связывания является результатом перераспределения $^{125}I\text{-}T_3$ в процессе обработки ядер тритоном и солевыми растворами, была отвергнута экспериментально. Оказалось, что аналогичная доля $^{125}I\text{-}T_3$ ядер (60—80%) связана хроматином, выделенным непосредственно из очищенных ядер центрифугированием в градиенте плотности. Таким образом, эти исследования показали, что специфические связывающие $T_3$ места в ядрах связаны с хроматином. Иным было распределение в ядрах неспецифически связанного $T_3$, например, при одновременном введении индикаторных количеств $^{125}I\text{-}T_3$ и избытка немеченого гормона. В этом случае 80—90% $^{125}I\text{-}T_3$ ядер удалялось в результате обработки 0,2% раствором тритона. Таким образом, неспецифические участки связывания, обладающие низким сродством и неограниченной емкостью для гормона, локализуются, согласно этим данным, на наружной ядерной мембране.

### Б. Белковая природа рецепторов

Некоторые свойства ядерных мест связывания $T_3$ были изучены с помощью солюбилизации $^{125}I\text{-}T_3$, связанного с ядерными рецепторами. Для этого ядра печени животных, получавших $^{125}I\text{-}T_3$ in vivo, обрабатывали 0,4 М KCl. Такая обработка позволяет проэкстрагировать из ядер 60—80% $^{125}I\text{-}T_3$, 50% белка и лишь 5% ДНК. По данным хроматографии на сефадексе проэкстрагированный 0,4 М KCl $^{125}I\text{-}T_3$ находился в комплексе с макромолекулами. Поскольку этот комплекс легко разрушался протеолитическими ферментами, но не ДНКазой и РНКазой, можно было сделать заключение о белковой природе ядерных связывающих участков. Экспериментально было показано, что комплекс $^{125}I\text{-}T_3$ с ядерным белком к действию трипсина более устойчив, чем к действию химотрипсина. Известно, что негистоновые ядерные белки отличаются от гистонов более низким содержанием остатков аргинина и лизина. Это позволило предположить, что связывающий $T_3$ ядерный белок относится к негистоновым белкам. В пользу этого предположения свидетельствует также тот факт, что

в слабощелочной среде (pH 8,5) 0,4 M KCl экстрагировал намного больше комплексов $^{125}I$-$T_3$ с ядерным белком (76%), чем в умеренно кислой (pH 6,0) среде (30%). Размеры комплексов $^{125}I$-$T_3$ с негистоновым белком, получаемых экстракцией ядер 0,4 M KCl, были определены хроматографией на сефадексе G-100. По данным этих экспериментов, мол. вес рецепторов $T_3$ составляет 60 000—70 000 дальтон, если принять, что этот белок является глобулярным.

## В. Характерные особенности связывания

Для изучения ряда других свойств комплексов $T_3$ с ядерным белком также использовали 0,4 M KCl экстракт ядер [22]. Сразу после солюбилизации ядерных белков 60—80% проэкстрагированного $^{125}I$-$T_3$ находилось в комплексе с белком. Стабильность гормон-белковых комплексов была высокой при низкой температуре (от 0 до 4° С), но резко снижалась при 37° С. При использовании элюции с колонок сефадекса для измерения доли связанного и свободного гормона оказалось, что количество белка в исключаемом объеме колонки значительно снижается после инкубации экстрактов при 37° С. Эти данные позволили думать, что снижение связывания гормона в таких условиях может быть результатом протеолиза. Вместе с тем нельзя исключить и возможность простого ускорения диссоциации комплексов $^{125}I$-$T_3$ со связывающими местами белка. Если к выделенным экстракцией $^{125}I$-$T_3$-белковым комплексам добавляли при 0—4° С избыток немеченого $T_3$ (0,153 мкМ), то вытеснения $^{125}I$-$T_3$ из комплексов, сформированных in vivo, не происходило. Иными словами, в данных условиях молекулы связанного $T_3$, очевидно, не могут замещаться другими молекулами $T_3$. Обработка 5 M мочевиной приводила, однако, к полному разрушению гормон-белковых комплексов. Попытки выявить специфическое связывание $T_3$ в 0,4 M KCl экстрактах после разрушения комплексов с эндогенным гормоном с помощью инкубации при 37° С или обработки 5 M мочевиной дали в этих ранних работах отрицательный результат. Позднее, однако, Сэмюэлсу и др. [23, 24] удалось подобрать подходящие условия для обнаружения специфического связывания $T_3$ солюбилизированными ядерными рецепторами.

Бóльшая часть наблюдений, касающихся природы и свойств экстрагируемых 0,4 M KCl комплексов $T_3$ с ядерным белком, была подтверждена в исследованиях де Гроота и др. [25]. Эти авторы отделяли связанный с рецепторами $^{125}I$-$T_3$ от свободного $^{125}I$-$T_3$ ионообменной хроматографией, диализом и электрофорезом в агарозном геле. Как и в работах, описанных выше, связывание гормона, согласно этим исследованиям, было стабильным при 0° С в течение 120 мин, но практически полностью разрушалась при 37° С за 10 мин или при обработке мочевиной. Более того, добав-

ление избытка немеченого $T_3$ не влияло на связывание $^{125}I-T_3$. Специфического связывания $^{125}I-T_3$ при его добавлении к 0,4 М KCl экстрактам ядер in vitro обнаружить не удалось.

Эти авторы четко показали, что для связывания $T_3$ с рецепторами, очевидно, важны сульфгидрильные группы [25]. Было обнаружено, что проэкстрагированные комплексы $^{125}I-T_3$ с ядерным белком разрушаются при добавлении парахлормеркурийбензоата; этот эффект предотвращается добавлением дитиотрейтола. Были описаны также результаты экспериментов по реконструкции, согласно которым при снижении концентрации соли в ядерном экстракте ниже 0,2 М связывание $^{125}I-T_3$-белковых комплексов с хроматином возрастает по сравнению со связыванием альбумина или добавленного in vitro $^{131}I-T_3$. Однако, поскольку белки ядер в этих условиях могли просто агрегировать, следовало бы проверить, имеют ли обнаруженные «акцепторы» комплексов $T_3$ с ядерным белком какое-либо отношение к хроматину. Только после такой проверки можно говорить о специфичности взаимодействия с хроматином комплексов $T_3$ с ядерным белком.

Для более детального изучения взаимодействия $T_3$ с ядерными рецепторами в ряде лабораторий была проведена большая работа по выявлению условий, которые позволяли бы наблюдать специфическое связывание $T_3$ в ядрах in vitro. Для этой цели использовались либо интактные ядра, либо различные препараты нуклеопротеидов. Впервые о связывании гормона с ограниченной емкостью изолированными ядрами сообщили Сэмюэлс и Цай [19], использовавшие в качестве источника ядер клетки $GH_1$ из гипофиза. В последующих публикациях эти авторы доказали, что связывающая емкость ядерных мест, измеренная путем инкубации с гормоном интактных клеток $GH_1$, равна их емкости, измеряемой при инкубации с гормоном изолированных ядер [26]. Кажущаяся константа диссоциации мест связывания с гормоном ($1{,}65 \cdot 10^{-10}$ М), измеренная после инкубации ядер с гормоном, была выше аналогичной величины ($2{,}9 \cdot 10^{-11}$ М), определенной путем инкубации с гормоном целых клеток. Возможно, эта разница обусловлена изменением окружающей ядра среды в процессе их выделения и инкубации. Теми же авторами было показано наличие связывающих мест с ограниченной емкостью в ядрах лимфоцитов человека [27] и в изолированных ядрах клеток печени [26]. Интересно, что величины и кажущейся $K_d$, и связывающей емкости в ядрах клеток печени, и $GH_1$-клеток были одинаковы. Ранее Оппенгеймер и др. [11] сообщили, что по результатам экспериментов in vitro в различных тканях крыс кажущиеся равновесные константы ассоциации ядерных участков с гормоном совпадают, а связывающая емкость этих участков различна.

Недавно было проведено сравнительное изучение характеристик связывания $T_3$ ядрами клеток печени крыс in vivo и in vitro изолированными клеточными ядрами печени [28, 29]. Основное раз-

личие в связывании $T_3$, наблюдаемом in vivo и in vitro, заключается в уровне неспецифического связывания иодтиронинов. Если ядра печени выделяли через соответствующий период времени после введения in vivo индикаторной дозы $^{125}$I-$T_3$, то $^{125}$I-$T_3$ ядер на 80—90% был специфически связан белком хроматина. Если же изолированные ядра инкубировали с $^{125}$I-$T_3$ in vitro в буферном растворе, не содержащем белка, то бóльшая часть радиоактивного $T_3$, обнаруживаемого в повторно выделенном ядерном осадке, была неспецифически связана с наружной ядерной мембраной (ядра извлекали из инкубационной среды 30—60% $^{125}$I-T). Связанный с хроматиновыми местами $^{125}$I можно, однако, измерить после обработки таких ядер детергентом тритоном Х-100, удаляющим наружную ядерную мембрану [9]. Несмотря на такие различия, специфическому связыванию $T_3$ in vitro и in vivo присущ ряд общих свойств, что указывает на идентичность специфических мест связывания $T_3$ с ограниченной емкостью, обнаруживаемых в экспериментах in vitro и в исследованиях, проведенных in vivo с использованием эндогенного гормона. Связывающая емкость ядер, по данным измерений in vitro, составляла 0,3—0,5 нг $T_3$ на 1 мг ДНК. Таким образом, она не отличалась от аналогичных величин, полученных в экспериментах in vivo [10, 11]. Исследование кинетики взаимодействия $T_3$ со связывающими местами ядер показало, что скорость диссоциации таких комплексов, полученных in vivo и in vitro, совпадает (средняя величина $t_{1/2}=12$ мин при 37° С). Кроме того, относительное (по сравнению с $T_3$) сродство ядерных мест связывания к ряду подтирониновых аналогов в экспериментах in vitro хорошо совпадало с данными, полученными ранее in vivo [16]. И наконец, условия экстракции $^{125}$I-$T_3$, специфически связанного ядерными местами in vitro, и профили элюции таких комплексов с колонок сефадекса G-100 были такими же, как и в случае введения гормона in vivo до выделения ядер. В других работах было показано, что присутствие ряда метаболических ингибиторов при инкубации ядер с гормоном не снижает специфического связывания $T_3$. Таким образом, для взаимодействия $T_3$ с рецепторами нет, по-видимому, необходимости в активном метаболизме.

Результаты, сходные с описанными выше, недавно получили ДеГроот и Торресани [30]. Эти авторы, кроме того, исследовали влияние различных компонентов буфера на связывание. При определенных условиях добавление дитиотрейтола приводило к значительному увеличению интенсивности связывания.

Изучение взаимодействия с ядрами большого количества ранее не исследованных в этом отношении иодтирониновых аналогов стало возможным благодаря созданию системы in vitro, позволяющей измерять связывание $T_3$ ядерными рецепторами. Такая система, как было установлено, обладает теми же свойствами, что и система ядерного связывания $T_3$ in vivo. Это в свою очередь дало возможность сравнить способность аналогов взаимодействовать с рецепторами и их биологическую активность на целом организ-

ме [31]. Было установлено, что связывание аналогов с рецепторами ядер печени хорошо коррелирует с биологической активностью этих соединений. Оказалось, что и для связывания с ядрами, и для проявления биологической активности оптимальным является дистальное расположение 3′-группы относительно нефенольного кольца, причем 3′-группа может быть и галогеновой, и негалогеновой. Аналоги с заместителями в 3′-м положении были более активны по сравнению с аналогами, имеющими заместители и в 3′-, и в 5′-положениях. 4′-гидроксильная группа имеет, по-видимому, существенное значение для связывания, но атом кислорода можно заменять на атом серы или на метиленовую группу. Некоторые лишенные галогена аналоги обладали значительной биологической и связывающей активностью. Корреляция между способностью аналогов к связыванию и их биологической активностью служит доказательством физиологической значимости ядерных связывающих мест. С другой стороны, эти данные показывают, что метод определения связывания in vitro мог бы оказаться удобным для скрининга больших серий аналогов с целью отбора таких соединений с агонистической или антагонистической активностью по отношению к гормонам щитовидной железы, у которых наличие этих свойств ранее не ожидалось.

Последующие усилия исследователей были направлены на выяснение роли цитозольного белка для транслокации $T_3$ из цитоплазмы к ядерным рецепторным местам. Существование белка цитозоля, связывающего $T_3$ и $T_4$, было ранее установлено в ряде лабораторий [32—37]. В недавно проведенных исследованиях Диллман и др. [38] определили сродство и емкость связывающих мест цитозольного белка и сравнили их с соответствующими характеристиками ядерных мест. В цитозоле действительно был обнаружен определенный класс мест связывания $T_3$ с ограниченной емкостью. Однако между цитозольными и ядерными связывающими местами обнаружена большая количественная разница. Так, кажущаяся константа ассоциации цитозольного белка к $T_3$ была в 200 раз ниже соответствующей величины для ядерных рецепторов, а связывающая емкость в 250 раз выше. Вычисления, основанные на данных о концентрации $T_3$ у животных с нормальной функцией щитовидной железы, показали, что эндогенный $T_3$ насыщает менее 1% цитозольных связывающих мест. В то же время связывающие места ядер печени, по данным экспериментов in vivo, насыщены эндогенным $T_3$ на 47% [11]. Дальнейшие исследования показали, что относительное сродство ряда аналогов $T_3$ к цитозольным местам связывания существенно отличается от их относительного сродства к связывающим местам ядер. В независимо выполненной работе Сэмюэлса и др. [24] также обнаружены значительные различия между величинами кажущихся констант ассоциации цитозольных и ядерных мест гипофизарных клеток $GH_1$ для $T_3$ или $T_4$. Большие количественные различия в связывающих свойствах цитозольных и ядерных мест связывания

свидетельствуют о том, что для взаимодействия $T_3$ с ядерными рецепторами нет необходимости в комплексировании гормона с цитозольным белком.

В пользу этого заключения говорит также то, что добавленный в водную среду $T_3$ взаимодействует со специфическими ядерными местами и в качественном, и в количественном отношении сходно с взаимодействием $T_3$ с этими местами in vivo [29]. Более того, если в инкубационную систему добавляли небольшие количества цитозоля, недостаточные для существенного изменения концентрации свободного $T_3$, то увеличения связывания гормона ядрами не наблюдалось. Была рассмотрена также возможность того, что эндогенный $T_3$, обнаруживаемый в ядрах, связан со специфическим цитозольным белком, который функционирует как челнок, связывая гормон у поверхности ядерной мембраны и транспортируя его к рецепторам хроматина. Тот факт, что количественные характеристики связывания гормона ядрами, выделенными из клеток крыс с удаленной щитовидной железой (и, следовательно, лишенных эндогенного гормона), и ядрами из клеток животных с нормальной функцией щитовидной железы были во всех отношениях одинаковыми, по-видимому, исключает такую возможность. Итак, для проникновения $T_3$ в ядро и связывания со специфическими рецепторными местами, видимо, не требуется, чтобы гормон первоначально связывался специфическими цитозольными белками. Данный вывод позволяет отделить гормоны щитовидной железы от стероидных по механизму их транслокации из цитозоля в ядро [39].

Хотя в более ранних исследованиях специфическое связывание $T_3$ удавалось обнаружить лишь в условиях целостного организма или в системе изолированных ядер, последние работы показали, что связывающую активность ядер можно выделить, экстрагируя ядра различными солевыми растворами. Сэмюэлс и др. [23, 24] обнаружили присутствие мест связывания с ограниченной емкостью и высоким сродством к гормону в ядерных экстрактах, полученных обработкой изолированных ядер раствором 0,4 М KCl, содержащим 5,0 нМ дитиотрейтола, при pH 7,85. Связывающей активностью обладали экстракты ядер и печени, и почек, и гипофизарных $GH_1$-клеток. Изучение кинетики связывания показало, что величины кажущейся $K_d$, полученные на экстрактах ядер клеток печени и $GH_1$-клеток, были точно такими же, как и при использовании изолированных ядер соответствующих типов клеток. Более того, как и в случае экспериментов с изолированными ядрами и целыми $GH_1$-клетками, сродство связывающих мест в ядерных экстрактах к $T_4$ составляло $^1/_{10}$ от сродства к $T_3$. Связывающая активность в экстрактах ядер была нечувствительна к обработке ДНКазой и РНКазой, но терялась под действием протеолитических ферментов — проназы и трипсина. При изучении поведения рецепторов экстрактов ядер при хроматографии на сла-

бом ионообменнике Bio-Rex 70 были получены данные, свидетельствующие о том, что рецептор является негистоновым белком. Итак, солюбилизированная связывающая активность ядер обладает, видимо, теми же свойствами, что и рецепторы, образующие комплексы с меченым гормоном in vivo (что было описано выше) [22].

Связывающие места с ограниченной емкостью для $T_3$ были также обнаружены во фракции негистоновых белков ядер печени крыс. Томопоулос и др. [40] выделяли негистоновые белки с помощью хроматографии на колонках и измеряли константы скорости ассоциации и диссоциации при 4° С. Полученная на основании этих данных величина $K_d$ для препарата негистоновых белков ($1{,}6 \cdot 10^{-9}$ M) оказалась более высокой, чем соответствующая величина для 0,4 M KCl экстрактов ядер клеток печени ($1{,}57 \cdot 10^{-10}$ M) [24]. Связывающая емкость препарата негистоновых белков соответствовала данным измерений, проведенных in vivo [10, 11], а также результатам экспериментов, выполненных на клетках $GH_1$ [26] и на изолированных ядрах [26, 29, 30]. В процессе выделения негистоновых белков специфичность связывания частично терялась: эффективность $T_4$ и 3,5-дииодтиронина как конкурентов $^{125}I$-$T_3$ за специфические связывающие места составляла соответственно 60 и 40% эффективности немеченого $T_3$. По данным других исследований, сродство ядерных связывающих мест к $T_4$ значительно ниже сродства выделенных негистоновых белков, а связывание 3,5-дииодтиронина изолированными ядрами составляет менее 1% связывания $T_3$ [28, 31].

## IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные о том, что рецепторные связывающие места для $T_3$ принадлежат негистоновому ядерному белку, представляют особый интерес, поскольку введение животным $T_3$ усиливает синтез РНК и белка, а негистоновые белки рассматриваются в настоящее время как факторы, имеющие непосредственное отношение к контролю транскрипции ДНК [41]. Последующие исследования должны пролить свет на происходящие на уровне отдельных молекул события, которые сопровождают связывание гормона рецепторами и которые в конце концов и вызывают усиление белкового синтеза. Эти изменения, по всей видимости, лежат в основе действия гормонов щитовидной железы и на дифференцировку тканей, и на их созревание, и на поддержание клеточного обмена веществ.

**Благодарность**

Работа финансировалась фондами NIH AM 15421-14, NIH CA 16463-01 и фондом поощрения научных разработок 5 KO4 AM 19502-02 (MIS).

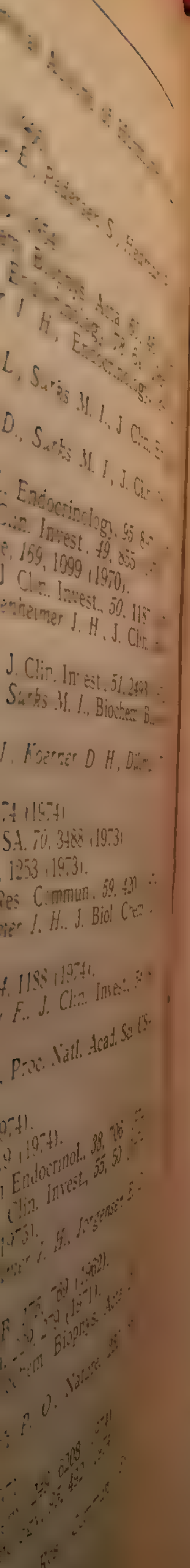
Авторы признательны миссис Мери Энн Маллен и мисс Джерри Моника за огромную помощь в работе над рукописью.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. *Oppenheimer J. H., Surks M. I.*, in: Biochemical Actions of Hormones (G. Litwack, ed.), Academic Press, New York, 1975.
2. *Tata J. R.*, Nature, *197*, 1167 (1963).
3. *Tata J. R., Widnell C. C.*, Biochem. J., *98*, 604 (1966).
4. *Tata J. R., Ernster L., Lindberg O., Arrhenius E., Pedersen S., Hedman R.*, Biochem. J., *86*, 408 (1963).
5. *Lee N. D., Williams R. H.*, Endocrinology, *54*, 5 (1954).
6. *Tata J. R., Ernster L., Suranyi E. M.*, Biochem. Biophys. Acta, *60*, 461 (1962).
7. *Heninger R. W., Larson F. C., Albright E. C.*, Endocrinology, *78*, 61 (1966).
8. *Schwartz H. L., Bernstein G., Oppenheimer J. H.*, Endocrinology, *84*, 270 (1969).
9. *Oppenheimer J. H., Koerner D., Schwartz H. L., Surks M. I.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., *35*, 330 (1972).
10. *Oppenheimer J. H., Schwartz H. L., Koerner D., Surks M. I.*, J. Clin. Invest., *53*, 768 (1974).
11. *Oppenheimer J. H., Schwartz H. L., Surks M. I.*, Endocrinology, *95*, 897 (1974).
12. *Braverman L. E., Ingbar S. H., Sterling K.*, J. Clin. Invest , *49*, 855 (1970).
13. *Sterling K., Brenner M. A., Newman E. S.*, Science, *169*, 1099 (1970).
14. *Pittman C. S., Chambers J. B., Jr., Read V. H.*, J. Clin. Invest., *50*, 1187 (1971).
15. *Surks M. I., Schadlow A. R., Stock J. M., Oppenheimer J. H.*, J. Clin. Invest., *52*, 805 (1973).

15a. *Oppenheimer J. H., Schwartz H. L., Surks M. I.*, J. Clin. Invest., *51*, 2493 (1972).

16. *Oppenheimer J. H., Schwartz H. L., Dillman W., Surks M. I.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *55*, 544 (1973).
17. *Oppenheimer J. H., Schwartz H. L., Surks M. I., Koerner D. H., Dillman W.*, Endrocine Res. Comm., *2*, 309 (1975).
18. *DeGroot L. J., Strausser J. L.*, Endocrinology, *95*, 74 (1974).
19. *Samuels H. H., Tsai J. S.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *70*, 3488 (1973).
20. *Samuels H. H., Tsai J. S., Cintron R.*, Science, *181*, 1253 (1973).
21. *Tsai J. S., Samuels H. H.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *59*, 420 (1974).
22. *Surks M. I., Koerner D., Dillman W., Oppenheimer J. H.*, J. Biol. Chem., *248*, 7066 (1973).
23. *Samuels H. H., Tsai J. S., Casanova J.*, Science, *184*, 1188 (1974).
24. *Samuels H. H., Tsai J. S., Casanová J., Stanley F.*, J. Clin. Invest., *54*, 853 (1974).
25. *DeGroot L. J., Refetoff S., Strausser J., Barsano C.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *71*, 4042 (1974).
26. *Samuels H. H., Tsai J. S.*, J. Clin. Invest., *53*, 656 (1974).
27. *Tsai J. S., Samuels H. H.*, J. Clin. Endocrinol., *38*, 919 (1974).
28. *Koerner D., Surks M. I., Oppenheimer J. H.*, J. Clin Endocrinol., *38*, 706 (1974).
29. *Surks M. I., Koerner D. H., Oppenheimer J. H.*, J. Clin. Invest., *55*, 50 (1974).
30. *DeGroot L. J., Torresani J.*, Endocrinology, *96*, 350 (1975).
31. *Koerner D., Schwartz H. L., Surks M. I., Oppenheimer J. H., Jorgensen E. C.*, J. Biol. Chem. (1975).
32. *Grimminger H., Heni F., Kallee E*, Z. Naturforsch. B, *175*, 769 (1962).
33. *Spaulding S. W., Davis P. J.*, Biochem. Biophys. Acta, *229*, 279 (1971).
34. *Hamada S., Torisuka K., Miyake T., Fukase M.*, Biochem. Biophys. Acta, *201*, 479 (1970).
35. *Sterling K., Saldanha V. F., Brenner M. A., Milch P. O.*, Nature, *250*, 661 (1974).
36. *Hamada S., Ingbar S. H.*, Endocrinology *88*, A-109 (1971).
37. *Davis P. J., Handwerger B. S., Glaser S.*, J. Biol. Chem., *249*, 6208 (1974).
38. *Dillman W., Surks M. I., Oppenheimer J. H.*, Endocrinology, *95*, 492 (1974).
39. *O'Malley B. W., Means A. R.*, Science, *183*, 610 (1974).
40. *Thomopoulos P., Dastugue B., Defer N.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *58*, 499 (1974).
41. *Gilmour R. S., Paul J.*, J. Mol. Biol., *40*, 137 (1969).



# Глава 17

## РЕЦЕПТОРЫ ПРОСТАГЛАНДИНОВ

*Ф. КЬЮЭЛ*

Merck Institute for Therapeutic Research
Rahway, New Jersey

### I. ВВЕДЕНИЕ

Наличие биологически активных соединений, в состав молекул которых включены радиоактивные изотопы, привело к буквальному «наводнению» научной литературы данными о связывании этих соединений тканями, клетками и клеточными фрагментами. Что касается сведений о связывании простагландинов, то в настоящее время волна публикаций на эту тему лишь только начинается. Возникает вопрос: действительно ли мы имеем дело с рецепторами или акцепторами, не является ли выявляемое связывание по своей природе неспецифическим?

Поскольку простагландины (ПГ) обладают рядом свойств, общих с жирными кислотами, было бы не удивительно, если бы оказалось, что они, подобно жирным кислотам, обладают определенным сродством к альбумину. Показано, что простагландины могут взаимодействовать с компонентами сыворотки [1] и плазмы [2], причем сродство данного простагландина к компонентам плазмы соответствовало его липофильности: ПГ-$A_1$>ПГ-$E_1$>ПГ-$F_{2\alpha}$. Природа этого связывания, однако, еще не установлена. Вполне возможно, что белки крови играют какую-то роль в транспорте простагландинов и регуляции их тканевого распределения, однако очень маловероятно, чтобы подобному взаимодействию ПГ с компонентами крови была присуща такая же высокая степень структурной специфичности, как это можно ожидать для взаимодействия ПГ с рецепторами. Высказывались также предположения о существовании специальной транспортной системы для ПГ, связанной с гемато-энцефалическим барьером [3], а также с элементами глаза [4]; однако специфичность выявленного взаимодействия была проверена недостаточно точно.

Согласно терминологии, предложенной Патоном [5], в качестве рецепторов или акцепторов можно рассматривать такие связывающие места, которые обладают высокой степенью тканевой специ-

фичности. Вообще под рецептором понимают компонент клетки, который при взаимодействии со специфическим стимулятором (обычно из внешнего для клетки источника) запускает последовательный ряд эффектов, характерных для данной клетки. Хотя обычно такие рецепторы расположены на наружной мембране, подобная локализация не является обязательной. Например, цитозольные рецепторы эстрогенов также удовлетворяют требованиям специфичности и инициации действия гормона. С другой стороны, взаимодействие может происходить и с такими связывающими местами, которые проявляют высокую специфичность, но функция которых заключается не в регуляции метаболических процессов в клетке, как у рецепторов, а в метаболизме данного лиганда [6]. Такие связывающие места мы будем называть акцепторами.

В данном обсуждении мы постараемся доказать, что существуют высокоспецифические места связывания ПГ, которые на основании принятой здесь классификации можно считать или истинными рецепторами, или акцепторами.

## II. РЕЦЕПТОРЫ ПРОСТАГЛАНДИНОВ ГРУППЫ Е

В последние годы был развернут широкий фронт исследований по изучению мембранных рецепторов пептидных гормонов. В то же время, за исключением рецепторов стероидов, рецепторы соединений липидной природы были обнаружены лишь в единичных случаях. Но, с другой стороны, трудно представить себе, как может осуществляться действие на ткани-мишени таких высокоактивных соединений, как ПГ (эффективная концентрация которых равна $10^{-10}$ М), без участия определяемого рецепторами механизма запуска и усиления эффекта. Данные о том, что некоторые структурные аналоги ПГ, и в особенности 7-окса-13-простиноевая кислота, способны конкурентно подавлять контрактильное действие ПГ, свидетельствуют в пользу существования рецепторов [7]. Сообщение о существовании количественной зависимости между способностью ПГ стимулировать образование циклического АМФ в яичниках мышей и конкурентным ингибированием этого эффекта под действием 7-окса-13-простиноевой кислоты свидетельствует о конкуренции между агонистом и антагонистом за общее связывающее место [8]. Таким образом, полученные данные, если не прямо, то, во всяком случае, достаточно убедительно указывали на существование рецепторов.

### А. Свойства рецепторов ПГ-Е

Первое прямое доказательство существования рецепторов ПГ, основывающееся на данных по истинной конкуренции между мечеными и немечеными ПГ, было получено на интактных липоцитах [9]. Последующие исследования показали, что связывающую

фракцию можно отделить от других компонентов гомогената жировых клеток, используя ее высокое сродство к липидному слою. Препарат получали просто центрифугированием гомогената в соответствующих условиях и отделением промежуточного осадочного слоя, масса которого составляла $^1/_{100}$ массы жировой клетки [10]. Другие авторы, работая с тенями жировых клеток, также обнаружили аналогичное связывание ПГ [10]. Сходные связывающие места, взаимодействующие преимущественно с ПГ-Е, обнаружены к настоящему времени также в ткани и (или) субклеточных фракциях печени [11], щитовидной железы [12], желтого тела [13], железистого желудка крыс [14], эпителия кишечника [15], тромбоцитов [16], надпочечников [17], лимфоцитов [18] и тимоцитов [19]. Полученные величины констант диссоциации для ПГ-Е во всех случаях были очень близки (порядка $10^{-9}$ М).

При изучении сродства связывающего препарата из лимфоцитов к различным ПГ было обнаружено, что только ПГ-Е обладают высоким сродством к связывающим местам. Сродство других простагландинов было на 2 порядка ниже. Интересно, что сродство различных ПГ к этим препаратам рецепторов хорошо коррелировало с их способностью ингибировать индуцируемое гормоном повышение содержания циклического АМФ в жировых клетках (ПГ-$E_1$ в обоих отношениях был активнее ПГ-$F_{1\alpha}$) [20]. Аналогичное количественное соотношение между способностью этих двух ПГ повышать содержание циклического АМФ обнаружено в опытах с изолированными яичниками мышей. Данный факт носит общий характер: действие ПГ практически на все исследованные в этом отношении ткани связано с повышением содержания циклического АМФ, причем соотношение эффективности ПГ всегда одно и то же (ПГ-Е>ПГ-А>ПГ-F) [21].

Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что связывание различных простагландинов и их аналогов рецепторами липоцитов отличается высокой избирательностью. Более детальный анализ значения особенностей структуры простагландинов был проведен нами ранее [22]. Достаточно сказать, что высокая специфичность связывания обеспечивается в первую очередь целостностью 9-карбонильной группы циклопентанового кольца и гидроксильной группы 15-S. Интересно также отметить, что между сродством различных соединений к рецепторам липоцитов и их способностью стимулировать синтез циклического АМФ в изолированных яичниках мышей имеется, как уже упоминалось, очень хорошая корреляция (табл. 1). Более того, поскольку биологическая активность простагландинов в исследованных случаях в целом соответствовала способности этих соединений связываться и стимулировать образование циклического АМФ, полученные данные, по-видимому, могут служить доказательством идентичности связывающих мест и рецепторов простагландинов группы Е.

Таблица 1

**Влияние структуры простагландинов на их связывание рецепторами ПГ-Е липоцитов [1] [22].**

| Соединение | Строение | Связывающая активность | Накопление цАМФ | Соединение | Строение | Связывающая активность | Накопление цАМФ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (Природный) ПГ-$E_1$ | | 1 | 1 | ПГ-$F_{2\alpha}$ | | 0,05 | 0,02 |
| (Энантомер) ПГ-$E_1$ | | 0.01 | 0 | ПГ-$A_1$ | | 0,01 | 0,02 |
| ПГ-$E_2$ | | 0,6 | 0,8 | 13, 14-дигидро-11-дезокси-ПГ-$E_1$ | | 0,1 | 0,45 |
| 15-кето-ПГ-$E_1$ | | 0,01 | 0,8 | (±)-15-окси-9-кетоэйкозановая кислота | | $5\cdot10^{-6}$ | 0 |
| (±)-8-(3-оксипропионил)-12-оксигептадекановая кислота | | $2\cdot10^{-4}$ | 0,005 | (±)-9-ацетил-12-оксигептадекановая кислота | | $5\cdot10^{-4}$ | 0,05 |

[1] Константа диссоциации для ПГ-$E_1$ равна $10^{-9}$М. Для сравнения со сродством других простагландинов, менее активных, чем ПГ-$E_1$, эта величина принята за 1. Связывающую активность вычисляли по соотношению сродства данного соединения к сродству ПГ-$E_1$. Эффективность простагландинов определяли при разной их концентрации, и лишь после этого определяли величины их относительной активности. Для того чтобы можно было сравнить данные по стимуляции циклического АМФ и связыванию, величины активности простагландинов соотносили с ак тивностью ПГ-$E_1$, которую принимали за 1. Под действием ПГ-$E_1$ в дозе 1 мкг/мл образование циклического АМФ в яичниках мышей обычно увеличивалось примерно в 40 раз. В эксперименте сравнивали степень стимуляции образования циклического АМФ под действием ПГ $E_1$ (1 мкг/мл) и других простагландинов. Представлены средние величины из двух определений

## Б. Взаимосвязь между рецепторами ПГ-Е и аденилатциклазой

*Механизм, обеспечивающий повышение содержания циклического АМФ.* Выдвинутое в первых работах [8, 23] предположение о том, что действие простагландинов Е опосредуется циклическим АМФ, находит все новые подтверждения в исследованиях, проводимых на разных тканях, чему недавно был посвящен специальный обзор [24]. Если подобная взаимосвязь между действием ПГ-Е и циклическим АМФ действительно существует, то рецепторы ПГ-Е должны быть каким-то образом связаны с одним или несколькими ферментами, регулирующими содержание этого циклического нуклеотида (т. е. с аденилатциклазой, фосфодиэстеразой, или ферментами, регулирующими содержание АТФ — предшественника циклического АМФ). Поскольку гормоны и другие клеточные регуляторы, как было установлено, повышают содержание циклического АМФ путем активации аденилатциклазы, можно было ожидать, что таким же образом действуют и ПГ. К сожалению, действие ПГ на циклический АМФ, наблюдаемое в интактных тканях, в процессе фрагментирования клеток в большинстве случаев теряется. Это можно наблюдать и на примере липоцитов, и на примере яичников мышей. В гомогенатах же тканей, отвечающих на ПГ-Е повышением содержания циклического АМФ, стимулирующее действие ПГ на превращение меченого АТФ в циклический АМФ (что служит мерой аденилатциклазной активности) сохраняется. При этом соотношение эффективности, с которой различные простагландины влияли на содержание циклического АМФ в гомогенате и в интактной ткани, было одинаковым. Это положение можно проиллюстрировать следующими примерами: ПГ-$E_1$ стимулировал аденилатциклазу миокарда морских свинок в большей степени, чем другие исследованные простагландины [25]; эффективность действия ПГ на растворимую аденилатциклазу меланомы S91 Клаудмана была следующей: ПГ-$E_1$ > ПГ-$A_1$ > ПГ-$F_{2\alpha}$ [26]; ПГ-$E_1$ обладал наибольшим сродством к связывающим местам фракции частиц, выделенных из надпочечников, и одновременно являлся наиболее эффективным стимулятором активности аденилатциклазы [27]. Приведенные примеры дают основание предположить, что повышение содержания циклического АМФ, обусловленное стимуляцией аденилатциклазы, является следствием связывания ПГ рецепторами ПГ-Е. Таким образом, влияние ПГ-Е на функционирование клетки опосредуется, по-видимому, таким же способом, как и действие тропных гормонов: в обоих случаях циклический АМФ, очевидно, играет роль второго посредника.

Хотя препарат липоцитов, связывающий ПГ, содержал 94% всей аденилатциклазы жировой клетки, а этот фермент оставался чувствительным к стимулирующему действию АКТГ, адрена-

лина и ионов фтора, ПГ-$E_1$ не оказывал влияния ни на исходную, ни на стимулированную гормонами скорость превращения АТФ в циклический АМФ [28, 29]. Поскольку имелись данные о способности ПГ вызывать транслокацию фосфодиэстеразы [30] и действовать на АТФазу в тромбоцитах [31], в препаратах рецепторов липоцитов измеряли активность и фосфодиэстеразы, и АТФазы. Было обнаружено, что действительно оба эти фермента присутствуют в связывающем препарате, однако добавление ПГ не приводило к изменению их активности [28, 29]. Таким образом, присутствие в гемогенатах липоцитов функционирующих рецепторов — условие, недостаточное для действия ПГ-Е. Очевидно, что для проявления биологической активности ПГ-Е необходимо сохранение целостности структуры клетки. Механизм же, с помощью которого эти соединения снижают содержание циклического АМФ, еще не изучен. Тем не менее известно, то связывание ПГ с рецепторами ПГ-Е липоцитов коррелирует с их способностью вызывать увеличение содержания циклического АМФ в яичниках мышей и в других тканях. Это свидетельствует о том, что рецепторы всех типов клеток, изученных к настоящему времени, аналогичны рецепторам липоцитов.

### В. Локализация рецепторов ПГ-Е

Поскольку было обнаружено, что препарат рецепторов ПГ-Е содержит большую часть аденилатциклазы, а аденилатциклаза является ферментом, связанным с мембранами, очевидно, что рецепторы ПГ-Е также ассоциированы с мембранами. Кроме того, было показано, что связывание ПГ ассоциировано с мембранными фракциями желтого тела коров [13], адипоцитов [10], печени [11] и щитовидной железы [12]. Находятся ли рецепторы во внутреннем (подобно аденилатциклазе) или внешнем слое клеточной мембраны, неизвестно. Вместе с тем было показано, что присоединенный к сефарозе ПГ-$E_2$ способен задерживать тромбоцитообразующие лейкоциты [32], аденилатциклазная активность которых чувствительна к этому ПГ [33]. Таким образом, в данном случае рецепторы ПГ-Е были доступны действию внеклеточных стимулов. Вывод из этого наблюдения о локализации рецепторов ПГ-Е на наружной поверхности клеточной мембраны следует, однако, принимать с осторожностью. С одной стороны, необходимо подтвердить эти данные на том же объекте, с другой — следует выяснить, насколько данный феномен характерен для других типов клеток. Отсюда вытекает, что вопрос об однозначном установлении локализации рецепторов ПГ-Е в мембране остается открытым.

## Г. Взаимодействие между рецепторами ПГ-Е, аденилатциклазой и другими мембранными рецепторами

По данным конкурентного анализа мембранные рецепторы ПГ-Е представляют собой, очевидно, компоненты, отличные от рецепторов других гормонов. Точно установлено, что рецепторы ПГ-Е отличны от рецепторов адреналина в жировых клетках [9], ЛГ в лютеальных клетках [13], АКТГ в надпочечниках [17], адреналина и гистамина в лейкоцитах [32] и тиреотропного гормона в щитовидной железе [12].

О существовании такого рода различий свидетельствует также тот факт, что у крысят в неонатальном периоде чувствительность яичников к ПГ-Е, судя по образованию циклического АМФ, появляется на 10 дней раньше возникновения чувствительности к ЛГ [34]. Относительно возможного существования какого-либо взаимодействия между рецепторами ПГ-Е и гормональными рецепторами, обусловливающими накопление циклического АМФ в данной клетке, единого мнения нет. При изучении аддитивных эффектов различных стимуляторов на аденилатциклазу, были получены данные, свидетельствующие и «за», и «против» возможного существования разных популяций аденилатциклазы, каждая из которых чувствительна к своему собственному стимулятору. Ясно, что подобный подход непригоден для изучения гетерогенных клеточных популяций или их гомогенатов. Клетки практически всех типов чувствительны к ПГ-Е, в то время как на тропные гормоны отвечают клетки далеко не всех типов. Благодаря этому возможно получение эффектов кажущейся аддитивности. Так, при действии ПГ-$E_1$ и ЛГ на интактные яичники мышей наблюдался аддитивный эффект; в то же время в опытах с изолированными лютеальными клетками такого эффекта не получено [21]. Аддитивности в действии ТТГ и ПГ-Е на клетки щитовидной железы также не наблюдалось [35]. Феномен аддитивности описан в отношении влияния АКТГ и ПГ-Е на активность аденилатциклазы надпочечников, но в этом случае мы встречаемся с той же проблемой: гомогенат получали не из однородной популяции клеток. Таким образом, вопрос о том, связаны ли рецепторы ПГ-Е и рецепторы других гормонов с одной и той же аденилатциклазой, остается открытым. Однако продуцируемый под действием любого стимулятора циклический АМФ независимо от природы стимулятора активирует, вероятно, одну и ту же протеинкиназу (об этом свидетельствует тот факт, что добавление циклического АМФ часто запускает специфическую функцию клетки). Поэтому существование двух различных аденилатциклаз кажется излишним.

В ряде случаев определенная связь между рецепторами ПГ-Е и рецепторами гормонов, по-видимому, существует. Так, антагонист ПГ, 7-окса-13-простиноевая кислота, обладающая хотя и небольшим, но измеримым сродством к рецепторам ПГ-Е, способна

блокировать стимулирующее действие на содержание циклического АМФ в яичниках мышей не только ПГ-Е, но и ЛГ [8]. Аналогичные данные получены в отношении действия ПГ-Е и ТТГ на клетки щитовидной железы [35]. Хотя при интерпретации этих результатов авторы пришли к выводу, что рецепторы ПГ-Е, возможно, играют роль промежуточных медиаторов или модуляторов гормонального действия, вопрос о степени специфичности данного антагониста ПГ является спорным. Это тем более сомнительно, что, как было установлено, 7-окса-13-простиноевая кислота блокирует стимулирующее действие холерного токсина на синтез циклического АМФ в яичниках мышей [36]. Поскольку действие холерного токсина направлено, вероятно, непосредственно на аденилатциклазу, возможно, что и 7-окса-13-простиноевая кислота действует непосредственно на аденилатциклазу. Очевидно, что многое в этом вопросе еще не ясно и нуждается в дальнейшем изучении.

## Д. Сравнение ПГ-$E_1$ и ПГ-$E_2$

До сих пор мы рассматривали рецепторы ПГ, участвующие в регуляции содержания циклического АМФ, как рецепторы ПГ-Е, не проводя различий между ПГ-$E_1$ и ПГ-$E_2$. И действительно, исследования по конкуренции показали, что во всех изученных системах (тромбоциты, жировые клетки, надпочечники) ПГ-$E_1$ и ПГ-$E_2$ взаимодействуют с одними и теми же рецепторами. Тем не менее при сравнительном анализе способности ПГ-$E_1$ и ПГ-$E_2$ стимулировать образование циклического АМФ было обнаружено, что для многих из изученных тканей эффективность этих двух ПГ органоспецифична [21]. Так, в яичниках мышей ПГ-$E_2$ лучше стимулировал образование циклического АМФ, чем ПГ-$E_1$; в тромбоцитах же обнаружена обратная ситуация. В последнем случае, несмотря на то что ПГ-$E_1$ и ПГ-$E_2$ конкурируют за одни и те же рецепторы, ПГ-$E_1$, согласно современным представлениям, препятствует агрегации тромбоцитов, поскольку повышает содержание циклического АМФ, а ПГ-$E_2$, наоборот, вызывает при определенных условиях агрегацию тромбоцитов [16]. Таким образом, наличие или отсутствие 5—6-двойной связи, отличающие ПГ-$E_2$ от ПГ-$E_1$, не является решающим фактором в связывании этих соединений рецепторами, но играет важнейшую роль в их действии на аденилатциклазу и, возможно, на другие ферменты, имеющие отношение к регуляции содержания циклического АМФ. С этой точки зрения карбоксильная боковая цепь ПГ-Е, содержащая 5—6-двойную связь, может быть связана с «каталитической» активностью молекулы ПГ. Но, с другой стороны, аденилатциклаза из сердечной мышцы морских свинок обладала иной специфичностью по отношению к стимулирующему действию ПГ (ПГ-$E_1$ > ПГ-$A_1$ > ПГ-$F_{2\alpha}$) [25]. В то же время по своему действию на солю-

билизированный препарат того же фермента все простагландины обладали примерно одинаковой эффективностью [37]. В связи с последним фактом возникает вопрос: не происходило ли в процессе солюбилизации разрушения рецепторов, и не являлась ли наблюдавшаяся активация аденилатциклазы результатом прямого действия молекул ПГ на растворимый фермент? Общим элементом структуры всех использованных в данном исследовании простагландинов служит карбоксильная боковая цепь, которая, как установлено, не имеет критического значения для феномена связывания [22]. Несмотря на то что 7-окса-13-простиноевая кислота не оказывала ингибирующего действия на базальный уровень активности аденилатциклазы; этот антагонист ПГ оказался эффективным ингибитором стимулируемой ПГ активности солюбилизированного фермента [37]. Обычно же для эффективного подавления действия ПГ-Е на аденилатциклазу фракции частиц требуется большой избыток этого антагониста ПГ. Приведенные данные позволяют думать, что действие 7-окса-13-простиноевой кислоты направлено непосредственно на аденилатциклазу, которая в составе мембраны аллостерически связана с рецепторами ПГ-Е. С этой концепцией согласуется и тот факт, что сродство 7-окса-13-простиноевой кислоты к рецепторам ПГ-Е оказывается значительно более низким (более чем в 1000 раз), чем можно было бы ожидать на основании данных о ее ингибиторном действии на циклический АМФ в яичниках мышей. Итак, вполне возможно, что 7-окса-13-простиноевая кислота первично влияет на каталитический компонент (аденилатциклазу) системы, регулируемой простагландинами.

## Е. Действие ГТФ на рецепторы ПГ-Е

Установлено, что ГТФ увеличивает диссоциацию комплексов глюкагона с его мембранными рецепторами [38]. В связи с этим полагали, что данное явление может иметь определенное значение для проявления способности глюкагона стимулировать аденилатциклазу. На мембранах тромбоцитов также был показан эффект синергизма в стимулирующем действии ГТФ и ПГ-$E_1$ на аденилатциклазу [39]. Аналогичный результат был получен при использовании мембранных частиц желтого тела кроликов [40]. Данные о вытеснении связанного ПГ-Е из мембран щитовидной железы быка под действием ГТФ [12, 41] прямо указывают на то, что ГТФ может изменять активность аденилатциклазы за счет влияния на связывание ПГ-Е. Но, с другой стороны, связывание ПГ-$E_1$ тенями липоцитов стимулируется ГТФ [10]. Возникает вопрос: не связаны ли эти различия каким-то образом с тем, что в жировых клетках ПГ-Е подавляют индуцируемое гормонами повышение содержания циклического АМФ, тогда как в щитовидной железе, желтом теле и большинстве других тканей ПГ-Е способ-

ствуют образованию циклического АМФ? Интересно отметить, что ГТФ не влиял на связывание ПГ-Е «рецепторным препаратом липоцитов» [9, 42], в котором большие мембранные фрагменты отсутствовали. Возможно, в процессе выделения этой связывающий фракции взаимосвязь ГТФ — аденилатциклаза — ПГ, обнаруживаемая в интактных жировых клетках, нарушается, за счет чего и аденилатциклаза оказывается нечувствительной к действию ПГ-$E_1$. Такому объяснению противоречит, однако, тот факт, что глюкагон сохранял способность стимулировать аденилатциклазу рецепторного препарата липоцитов [42]. Очевидно, в вопросе о влиянии ГТФ на действие ПГ-Е предстоит выяснить еще очень многое.

## III. РЕЦЕПТОРЫ ПРОСТАГЛАНДИНА $F_{2\alpha}$

В отличие от того, что известно о простагландинах группы Е, история изучения простагландинов группы F и их эффектов изобилует ошибками и противоречиями. В зависимости от вида животных различия в действии ПГ-F и других ПГ могут быть чисто количественными (матка человека), противоположными (бронхиолы человека) или характерными исключительно для ПГ-F (лютеолиз у овец и крыс). Во многих работах было обнаружено, что ПГ-F могут и имитировать стимулирующее действие ПГ-Е на образование циклического АМФ, и связываться рецепторами ПГ-Е, но для этого требуются высокие концентрации ПГ-F. В результате возникло предположение, что ПГ-F должны действовать на другие рецепторы через посредство иного медиатора [23]. Антагонизм в действии простагландинов Е и F in vivo можно наблюдать на примере контрактильной функции бронхиол и вен. Но попытки обнаружить подобный антагонизм in vitro, используя в качестве теста образование циклического АМФ, оказались неудачными [23]. Поэтому кажется вероятным, что слабое действие ПГ-F на данный параметр (активность ПГ-F составляет менее $^1/_{100}$ активности ПГ-$E_1$) не отражает истинной функции простагландинов группы F на клеточном уровне. Необходимость высоких, нефизиологических концентраций ПГ-F для воспроизведения действия ПГ-Е на связывание и стимулирование образования циклического АМФ отражает скорее всего неспособность рецепторов ПГ-Е различать простагландины групп Е и F при высоких концентрациях последних. Кроме того, более высокая в ряде случаев эффективность ПГ-$F_{2\alpha}$ в стимуляции сокращений гладких мышц не согласуется с более слабым связыванием ПГ-F рецепторами ПГ-Е и меньшей способностью ПГ-F стимулировать циклической АМФ.

Обнаружение реципрокных отношений между циклическим АМФ и циклическим ГМФ при действии различных стимуляторов привело к созданию Голдбергом и др. [43] новой концепции. Сог-

ласно этой концепции, регуляция клеточных функций осуществляется не только за счет изменений (повышения или понижения) содержания циклического АМФ, но и (что наиболее важно) за счет циклического ГМФ, причем действие циклического ГМФ противоположно действию циклического АМФ. В результате исследований, проведенных нами совместно с группой Голдберга, было показано, что ПГ-$F_{2\alpha}$ в концентрации $10^{-5}$ М уже через 45 с вызывает четырехкратное повышение содержания циклического ГМФ в матке крыс [23]. На основе этих данных, несмотря на их ограниченный характер, было выдвинуто предположение, что циклический ГМФ имеет столь же важное значение для действия ПГ-F, как циклический АМФ для действия ПГ-Е (т. е. предполагается, что циклический ГМФ опосредует эффекты ПГ-F) [23]. В результате изучения регуляции контрактильной функции вен было обнаружено, что расслабляющее действие ПГ-Е связано с повышением содержания циклического АМФ, в то время как контрактильный эффект ПГ-$F_{2\alpha}$ связан с повышением содержания циклического ГМФ [44, 45]. Эти данные согласуются с приведенной выше концепцией. Недавно выполненные исследования по действию пролактина на синтез РНК в молочной железе мышей дают основания думать, что в данном случае вторым посредником гормонального действия является ПГ-$F_{2\alpha}$, оказывающий свое влияние через циклический ГМФ [46]. Но, с другой стороны, результаты последних исследований механизма, с помощью которого эстрогены повышают содержание циклического ГМФ и ПГ-F матки в проэструсе, не согласуются с предположением о стимулирующем действии ПГ-F на содержание циклического ГМФ [47]. Хотя все эти данные свидетельствуют, по-видимому, о существовании определенной взаимосвязи между ПГ-$F_{2\alpha}$ и циклическим ГМФ в регуляции клеточных функций, природа этой взаимосвязи пока не ясна. Но уже вне зависимости от взаимодействия ПГ-$F_{2\alpha}$ с нуклеотидами данный простагландин обладает действием, присущим лишь ему одному. Это можно было объяснить лишь существованием высокоспецифичных рецепторов. Выявить подобные рецепторы с уникальной специфичностью для ПГ-$F_{2\alpha}$ удалось впервые Пауэллу и др. [48]. Эти авторы наблюдали специфическое связывание тритированного ПГ-$F_{2\alpha}$ мембранами желтого тела овец. Интересно, что для оптимального связывания было необходимо не только наличие 9-гидроксильной группы, характерной для ПГ-F, но и присутствие 5—6-двойной связи. Таким образом, рецепторы простагландинов группы F на самом деле являются рецепторами ПГ-$F_{2\alpha}$. Приведенные в табл. 2 данные показывают, что между связыванием ПГ рецепторами ПГ-$F_{2\alpha}$ и их лютеолитическим действием имеется достаточно хорошая корреляция. Ясно также, что рецепторы ПГ-F и рецепторы ПГ-Е предъявляют разные требова-

*Таблица 2*

**Сравнение рецепторов ПГ-$F_{2\alpha}$ клеток желтого тела и рецепторов ПГ-$E_1$ липоцитов** [1]

| Соединение | Структура | Связывание рецепторами ПГ-Е липоцитов | Связывание рецепторами ПГ-$F_{2\alpha}$ лютеальных клеток | Накопление циклического АМФ | Лютеолитическая активность (прогестерон, нг/мл) |
|---|---|---|---|---|---|
| ПГ-$F_{2\alpha}$ | OH, COOH, HO, OH | 0,05 | 1 | 0,02 | 0,1 : 0,1 |
| ПГ-$F_{1\alpha}$ | O, COOH, OH | 0,004 | 0,03 | 0 | 1,4 : 0,7 |
| ПГ-$F_{1\beta}$ | O, COOH, OH | 0,001 | 0,004 | | |
| ПГ-$E_2$ | O, COOH, OH | 0,6 | 0,02 | 0,8 | 6,5 0,7 |
| ПГ-$E_1$ | O, COOH, OH | 1 | 0,003 | 1 | 8,5 0,5 |

[1] Сравнение рецепторов ПГ-Е липоцитов и рецепторов лютеальных клеток. Связывающие свойства рецепторов ПГ-Е, определение циклического АМФ и интерпретацию данных см. в работе [22]. Изучение связывания с рецепторами ПГ-$F_{2\alpha}$ лютеальных клеток проводили по методу, описанному в работе [22], используя несколько концентраций каждого простагландина. О лютеолитической активности судили по снижению концентрации прогестерона у самок хомячков при введении животным 100 мкг простагландина. Контрольная величина равнялась 8,2±0,5 нг/мл. Детали экспериментов см. в работе Бермана и др. [53]. Концентрация прогестерона при введении ПГ $E_1$ была измерена Берманом [54]

ния к структуре лигандов. Какими-либо сведениями о связи между рецепторами ПГ-$F_{2\alpha}$ и циклическими нуклеотидами мы не располагаем.

## IV. УЧАСТКИ СВЯЗЫВАНИЯ ПРОСТАГЛАНДИНА А

Атталах и др. [49] обнаружили, что тритированный ПГ-$A_2$ способен связываться в надосадочной фракции (100 000 g) почек кролика; ПГ-Е и ПГ-F такой способностью не обладали. Работы других исследователей подтвердили этот факт; было, однако, высказано предположение, что наблюдаемое взаимодействие является результатом связывания с растворимым ферментом, метаболизирующим ПГ [50], а не с истинными рецепторами. Как обнаружили Куэл и др. [50], диуретический агент — этакриновая кислота — конкурирует за места связывания ПГ-А. С другой стороны, это соединение, по данным Ангаарда, подавляет простагландин-15-оксидегидрогеназу (ПГДГ). В результате возникло предположение, что данный фермент и обусловливает связывание ПГ-А в почках [50]. Проведенные недавно работы дали новые доказательства в пользу этого предположения. Связывание ПГ-А в надосадочной фракции ткани почек является, по-видимому, частично ковалентным. Оно включает 1—4-присоединение сульфгидрильной группы фермента ПГДГ к ненасыщенной карбонильной группе ПГ-А. Этакриловая кислота, как и ПГ-А, может взаимодействовать с сульфгидрильными группами, что, видимо, определяет ее способность конкурировать с ПГ-А за связывание ферментом [51]. С другой стороны, было показано, что фермент «узнает» и некоторые другие структурные особенности молекул ПГ. Таким образом, взаимодействие ПГ-А с ПГДГ почек является наиболее изученным примером взаимодействия ПГ не с рецепторами, а с акцепторами.

**Благодарность**

Аналоги простагландинов были любезно предоставлены д-ром Н. Вендлером, д-ром Д. Таубом и д-ром Р. Хофзоммером, а секо-аналоги простагландинов — д-ром Е. Краго, д-ром Дж. Бикингом и д-ром Р. Смитом из фирмы Merck and Co.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Raz A.*, Biochem. J., *130*, 631 (1972).
2. *Attallah A. A., Schussler G. C.*, Prostaglandins, *4*, 479 (1973).
3. *Litwack G., Filler R., Rosenfield S., Lictash N.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *55*, 977 (1973).
4. *Bito L. Z.*, in: Prostaglandins and Cyclic AMP (R. K. Kahn and W. E. M. Lands, eds.), Academic Press, New York, 1973, p. 213.
5. *Paton W. D. M.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *29*, 92 (1961).

6. *Birnbaumer L., Pohl S. L., Kaumann H. J.*, Adv. Cyclic Nucleotide Res., *4*, 239 (1974).
7. *Fried J., Santhanakrishnan T. S., Himizu J., Lin C. H., Ford S. H., Rubin B., Grigas E. O.*, Nature, *223*, 208 (1967).
8. *Kuehl F. A., Jr., Humes J. L., Tarnoff J., Cirillo V. J., Ham E. A.*, Science, *169*, 883 (1970).
9. *Kuehl F. A., Jr., Humes J. L.*, Proc. Natl. Acad. Sci., *69*, 480 (1972).
10. *Gorman R. R., Miller O. V.*, Biochim. Biophys. Acta, *323*, 560 (1973).
11. *Smigel M., Fleischer S.*, Fed. Proc., *32*, 454 (1973).
12. *Moore U. V., Wolff J.*, J. Biol. Chem., *248*, 5705 (1973).
13. *Rao C. V.*, Prostaglandins, *4*, 567 (1973).
14. *Miller O. V., Magee W. E.*, in Adv. Biosci. *9*, 83 (1973).
15. *Kantor H. S., Tao P., Kiefer H. C.*, Proc. Natl. Acad. Sci., *71*, 1317 (1974).
16. *McDonald J. W. D., Stewart R. K.*, J. Lab. Clin. Med., *84*, 111 (1974).
17. *Dazord A., Morera H. M., Bertrand J., Saez J. M.*, Endocrinology, *95*, 352 (1974).
18. *Melmon K. L., Weinstein Y., Sheaver G. H., Bourne H. R.*, in: Cyclic AMP, Cell Growth and the Immune Response (L. M. Lichtenstein and C. W. Parker, eds.), Springer-Verlag, New York, 1974, p. 114.
19. *Schaumburg B. P.*, Biochim. Biophys. Acta, *326*, 127 (1973).
20. *Butcher R. W., Baird C. E.*, J. Biol. Chem., *243*, 1713 (1968).
21. *Kuehl F. A., Jr., Humes J. L., Cirillo V. J., Ham E. A.*, Adv. Cyclic Nucleotide Res., *1*, 493 (1972).
22. *Oien H. G., Mandel L. R., Humes J. L., Taub D., Hoffsommer R. D., Kuehl F. A., Jr.*, *9*, 985 (1975).
23. *Kuehl F. A., Jr., Cirillo V. J., Ham E. A., Humes J. L.*, Adv. Biosci., *9*, 155 (1973).
24. *Kuehl F. A., Jr., Cirillo V. J., Oien H. G.*, in: Prostaglandins: Chemical and Biological Aspects (S. Karim, ed.), University Park Press, 1976.
25. *Klein I., Levey G. S.*, Metabolism, *20*, 890 (1971).
26. *Ham E. A., Cirillo V. J.*, личное сообщение.
27. *Dazord A., Morera A. M., Bertrand J., Saez J. M.*, Endocrinology, *95*, 352 (1974).
28. *Oien H. G., Humes J. L., Kuehl F. A., Jr.*, Fed. Proc., *32*, 803 (1973).
29. *Humes J. L., Oien H. G., Kuehl F. A., Jr.*, Methods in Receptor Research (M. Bletcher, ed.), Marcel Dekker, New York, 1976.
30. *Amer M. S., Marquis N. R.*, in: Prostaglandins in Cellular Biology (P. Ramwell and B. Pharriss, eds.), Plenum Press, New York, 1972, p. 93.
31. *Johnson M., Ramwell P. W.*, Adv. Biosci., *9*, 205 (1973).
32. *Weinstein Y., Melmon K. L., Bourne H. R., Sela M.*, J. Clin. Invest., *52*, 1349 (1973).
33. *Lichtenstein L. M., Gillespie E., Bourne H. R., Henney C. S.*, Prostaglandins, *2*, 519 (1972).
34. *Lamprecht S. A., Zor W., Tsafriri A., Lindner H. R.*, J. Endocrinol., *57*, 217 (1973).
35. *Sato S., Szabo M., Kowalski K., Burke G.*, Endocrinology, *90*, 343 (1972).
36. *Mandel L. R.*, личное сообщение.
37. *Levey G. S., Klein I.*, Life Sci., *12*, 41 (1973).
38. *Rodbell M., Krans H. M. J., Pohl S. L., Birnbaumer L.*, J. Biol. Chem., *246*, 1872 (1971).
39. *Krishna G., Harwood J. P., Barber A. J., Jamieson G. A.*, J. Biol. Chem., *247*, 2253 (1972).
40. *Birnbaumer L., Yang P.*, J. Biol. Chem., *249*, 7867 (1974).
41. *Wolff J., Cook C. H.*, J. Biol. Chem., *248*, 350 (1972).
42. *Oien H.*, личное сообщение.
43. *Goldberg N. D., Haddox M. K., Hartle D. K., Hadden J. W.*, in: 5th International Conference on Pharmacology, Krager, Basel, Switzerland, Vol. 5, 1972, p. 146.
44. *Dunham E. W., Haddox M. K., Goldberg N. D.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *71*, 815 (1974).

45. *Kadowitz P. J., Joiner J. P., Hyman A. L., George U. J.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. (1975).
46. *Rillema J. A.*, Nature, *253*, 466 (1975).
47. *Ham E. A., Cirillo V. J., Zanetti M. E., Kuehl F. A.. Jr.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1975).
48. *Powell W., Hammerström S., Samuelsson B.*, Eur. J. Biochem., *44*, 103 (1974).
49. *Attallah A. A., Payakkapan U., Lee J. B.*, Life Sci., *14*, 1521 (1974).
50. *Kuehl F. A., Jr., Oien H. G., Ham E. A.*, in: Prostaglandin Synthetase Inhibitors (H. J. Robinson and J. R. Vane, eds.), Raven Press, New York, 1974, p. 53.
51. *Ham E. A., Oien H. G., Ulm E. A., Kuehl F. A., Jr.*, Prostaglandins (1975).
52. *Oien H. G., Ham E. A., Ulm E. A., VandenHeuvel W. J. A., Kuehl F. A., Jr.*, в печати.
53. *Behrman H. R., Ng T. S., Orczyk G. P.*, Gonadotropins and Gonadal Function (N. R. Moudgal, ed.), Academic Press, New York, 1973, p. 332.
54. *Behrman H. R.*, личное сообщение.

Глава 18

# РЕЦЕПТОРЫ АЦЕТИЛХОЛИНА КАК КОМПОНЕНТЫ КАНАЛОВ ПРОНИЦАЕМОСТИ

Л. ПОТТЕР

Departments of Pharmacology and Physiology-Biophysics
University of Miami School of Medicine
Miami, Florida

## I. ВВЕДЕНИЕ

В нервно-мышечных соединениях поперечнополосатых мышц позвоночных, синаптические потенциалы которых изучены наиболее подробно, приход потенциала действия на окончания мотонейрона приводит к высвобождению ацетилхолина (АХ). Выделившийся АХ действует на наружную поверхность постсинаптической мембраны (т.е. мембраны мышечной клетки), вызывая увеличение ее проницаемости одновременно для ионов натрия, калия и кальция [1]. Это изменение в проницаемости зависит от количества АХ (порядка миллиона молекул), выделяемого под действием одного нервного импульса (см. [2] и далее). В результате через постсинаптическую мембрану за несколько миллисекунд происходит перенос суммарного электрического заряда, эквивалентного примерно $10^{10}$ одновалентных ионов, что приводит к генерации в окружающей мембране мышечного волокна потенциала действия. Сходные события развиваются при генерации синаптических потенциалов в соединениях нерва с электрическими пластинками электрических органов угрей (*Electrophorus*) и скатов (*Torpedo, Narcine*) и др. [3]. Таким образом, на каждую выделенную молекулу АХ приходится перенос через постсинаптическую мембрану заряда приблизительно 10 000 ионов. Этот эффект усиления позволяет объяснить, как тончайшее нервное волокно может возбудить гораздо более крупную мышечную клетку. Результаты проведенных в последнее время экспериментов дают основание думать, что элементарное изменение проводимости (характеризуемое переносом заряда, эквивалентного $2 \cdot 10^4$—$5 \cdot 10^4$ одновалентных ионов в миллисекунду) вызывается соединением с молекулой рецептора от одной до четырех молекул АХ (см. ниже). Ряд фактов указывает на то, что прохождение ионов сквозь мембрану осуществляется за счет их диффузии через так называемые каналы, а не за счет специальных переносчиков. Об этом говорит высокая скорость ионного потока на единицу проницаемости, большая величина общего потока на

квадратный микрометр постсинаптической мембраны (порядка $10^7$ ионов на мкм$^2$), а также тот факт, что скорость и направление перемещения ионов зависят от электрохимических градиентов по обе стороны мембраны [4]. Таким образом, механизм, обеспечивающий возникновение синаптического потенциала, можно представить себе в виде одного или нескольких рецепторов АХ, сопряженных по крайней мере с одним каналом для небольших катионов.

В настоящее время о молекулах никотиновых рецепторов поперечнополосатых мышц и электрических тканей известно больше, чем о любых других типах рецепторных молекул. Именно они были первыми «рецепторами», которые удалось выделить. Более того, анатомические, физиологические и биохимические данные с почти полной определенностью говорят о том, что эти молекулы не только узнают АХ на наружной поверхности постсинаптических мембран, но и обеспечивают также захват и перенос небольших катионов через мембраны. Выделение и продолжающееся изучение никотинового рецепторного гликопротеида можно, следовательно, рассматривать и как первый случай непосредственного выделения и изучения молекулы канала. Для этого белка здесь будет использован термин «рецепторная или рецепторно-канальная молекула», а термин «рецептор» в соответствии с физиологической и фармакологической литературой и обозначениями, применяемыми для рецепторных моделей, останется за теми субъединицами этих молекул, которые несут специфические места для узнавания АХ.

Бóльшая часть сведений о рецепторных молекулах получена за последние 5 лет. При исследовании рецепторных молекул пользовались тремя подходами: прямым изучением постсинаптических мембран с помощью разрушения замораживанием, а также получения тонких срезов и их негативным окрашиванием, анализом мембранных потенциалов и «шумового» тока через постсинаптические мембраны и использованием аффинных лигандов для рецепторов (сам АХ, декаметоний, d-тубокурарин, змеиные $\alpha$-нейротоксины, гистрионикотоксин и некоторые специфические сульфгидрильные реагенты). Никотиновым рецепторам и связанным с ними ионным каналам в последнее время было посвящено несколько интересных симпозиумов [5—8] и обзоров [9—13]. Поэтому нет особого смысла вновь суммировать подобные данные (например, доводы в пользу того, что альфа-нейротоксины являются наиболее специфичными, надежными и вообще наиболее ценными лигандами для изучения никотиновых рецепторов поперечнополосатых мышц и электрических тканей). Вместо этого в настоящей главе будут рассмотрены имеющиеся данные о локализации, количестве, структуре и функции рецепторных молекул. В наших представлениях о никотиновых рецепторах произошел важный скачок. Вначале эти рецепторы представляли как опреде-

ленные участки мембран, при взаимодействии с которыми агонисты (например, никотин) вызывают сокращение мышц [14]. За шестьдесят последующих лет фармакологи и физиологи, изучая активность (агонистическую и антагонистическую) большого количества соединений, по своей структуре сходных с АХ, выяснили специфичность рецепторов (см. [15]); физиологи с помощью локального нанесения АХ микроэлектродами установили с точностью до нескольких микрометров местоположение аппарата, обеспечивающего появление синаптического потенциала [16—19], и доказали ионную природу синаптических токов [1, 4, 20]. Однако сведения о рецепторах и каналах оставались разобщенными, относящимися по большой части к популяциям молекул, т. е. исследователям приходилось ограничиваться такими аспектами, как кривые зависимости доза — ответ и изменения проводимости. Теперь благодаря данным, полученным с помощью новых методов исследования, мы можем описать процесс генерирования синаптических потенциалов на уровне взаимодействия отдельных молекул и внутримолекулярных перестроек. Такое описание будет прямым, по крайней мере полуколичественным и аналитическим. Остаются, правда, невыясненными некоторые детали трехмерной структуры рецепторно-канальных молекул и те тонкие внутримолекулярные перестройки этих молекул под действием АХ, которые определяют быстрое раскрытие каналов и перемещение небольших катионов через постсинаптическую мембрану.

## II. ЛОКАЛИЗАЦИЯ

В нормально иннервируемых тканях рецепторные молекулы локализованы в постсинаптической мембране непосредственно под нервным окончанием; лишь небольшое количество рецепторов обнаруживается вне синаптической области. В денервированных мышцах рецепторные молекулы также находят, причем в этом случае рецепторы распределены равномерно по всей поверхности клетки.

При изучении локализации рецепторов и связанных с ними ионных каналов были успешно применены три различных подхода. Первый из них заключается в «прощупывании» поверхности мышечной или электрической клетки микроэлектродами, наполненными АХ. Нанося нейромедиатор ионофорезом и регистрируя деполяризацию той же клетки другим, обычно внутриклеточным электродом, удалось установить расположение сопряженных с каналами рецепторов с точностью до нескольких микрометров. При втором подходе (результаты применения которого были подтверждены только что описанным методом) используется способность змеиных α-нейротоксинов необратимо связываться рецепторами; для данного взаимодействия характерна чрезвычайно высокая специфичность. Местонахождение токсинов определяли методами

флуоресцентной или радиозотопной метки. Третий подход сводится к разрушению материала замораживанием или приготовлением тонких срезов и к изучению внутримембранных частиц постсинаптической мебраны. Правомерность использования данного подхода для изучения молекул рецепторов базируется прежде всего на близком соответствии между количеством и локализацией частиц в постсинаптических мембранах, с одной стороны, и количеством и локализацией рецепторных молекул, определяемых в экспериментах по связыванию токсинов, с другой стороны. Кроме того, частицы, получаемые многократным замораживанием, пронизывают бóльшую часть, если не весь поперечник постсинаптической мембраны. Очевидно, таким свойством должны обладать молекулы, формирующие структуру каналов.

Еще со времен Лэнгли [14] было известно, что мышцы чувствительны к лекарственным препаратам, наносимым в область нервно-мышечных соединений. С тех пор многие исследователи, работавшие с наполненными АХ микроэлектродами, показали, что (не считая небольшой чувствительности к АХ у окончаний мышц вблизи сухожилий) чувствительность к АХ в районе концевой пластинки намного выше, чем за ее пределами [16—19]. В одной из последних таких работ было обнаружено, что эффективность АХ при его нанесении в область концевой пластинки в 50 раз выше, чем при нанесении всего в нескольких микрометрах от концевой пластинки. После перерезки аксонов мотонейронов в мышцах наблюдается постепенное, в течение недель, повышение чувствительности к АХ вне концевой пластинки. При этом мембрана мышечной клетки, исходно лежавшая вне пределов нервно-мышечного соединения, приобретает чувствительность, почти равную чувствительности мембраны исходной концевой пластинки. Бóльшая часть чувствительности концевой пластинки после перерезки нерва сохраняется [16].

Эксперименты по изучению связывания $\alpha$-бунгаротоксина, меченного радиоактивными изотопами иода или водорода, подтвердили эти данные о локализации рецепторов. При воздействии на мышцы нормальной диафрагмы крыс токсином до получения полной блокады нервно-мышечной передачи и последующей продолжительной отмывке несвязанного токсина на долю концевой пластинки приходится приблизительно 85% суммарной связанной радиоактивности [21, 22]. Имеется, однако, некоторая неясность относительно природы остальных 15% радиоактивности, равномерно распределенной по всей поверхности клеток. Бóльшую часть этой радиоактивности не удается так легко проэкстрагировать детергентами с поверхности мышечной клетки. Биохимические свойства (скорость седиментации и скорость элюции при гель-фильтрации) материала из области, не относящейся к нервно-мышечному соединению, отличаются от свойств комплексов токсин — рецептор — детергент, выделяемых из области соединения (за

исключением случая мышц лягушки, о которых речь пойдет ниже). Здесь уместно отметить, что концевые пластинки занимают очень небольшую долю поверхности мышечных клеток (0,001—0,01% [2, 23, 24]), поэтому даже при очень низкой концентрации рецепторов за пределами концевой пластинки их абсолютное количество в мышце должно быть весьма высоким. В денервированной мышце одновременно с повышением чувствительности к АХ, наблюдаемом на протяжении нескольких недель, происходит повышение связывания $\alpha$-бунгаротоксина, причем связывание обнаруживается на всей поверхности клеток [21—22]. По неизвестной до сих пор причине в денервированных мышцах диафрагмы крыс связывание токсина обнаруживается в трех широких зонах, центры которых совпадают со средними точками каждой трети мышечного волокна. Создается впечатление, что в каждой клетке имеются три центра образования и (или) включения новых молекул рецепторов в клеточную оболочку [21]. Это можно было бы ожидать, если бы мышца имела тройную иннервацию. Но на самом деле такой иннервации нет. Исследования, проведенные с помощью радиоавтографии и флуоресцентной микроскопии, позволили более точно установить локализацию связанного токсина. Что касается количественной оценки рецепторов, то эти методы не дали существенного выигрыша. Именно с помощью радиоавтографии впервые было показано, что в иннервированных мышцах (диафрагмы) $\alpha$-бунгаротоксин локализуется в области концевых пластинок, а в денервированных мышцах данное соединение взаимодействует с гораздо большей частью поверхности клеток [25]. Эти данные были подтверждены результатами, полученными при исследовании ряда мышц радиоавтографией с помощью световой микроскопии (см., например, [24]). На фотографиях мышечных [26] и электрических [27] тканей, обработанных токсинами с флуоресцентной меткой, области флуоресценции точно совпадают с местоположением постсинаптических мембран. С помощью электронно-микроскопической радиоавтографии были получены новые данные о локализации рецепторов в концевых пластинках мышц [24, 28] и на подлежащей поверхности электрических пластинок [29]. Но, что особенно интересно, данный метод позволил установить, что в нормально иннервированных мышцах рецепторные молекулы концентрируются на выступающих частях складок постсинаптических мембран, расположенных в непосредственной близости от нервных окончаний [30]. Связывание же $^3$Н-диизопропилфторфосфата холинэстеразой концевых пластинок, напротив, происходит в углублениях складчатой поверхности постсинаптической мембраны [31]. Существующие морфологические методы позволяют получить еще более детальную картину локализации предполагаемых рецепторных молекул. С помощью фрагментации замораживанием было четко показано, что в иннервированных мышцах внутримембранные частицы диаметром 7,0—14,0 нм рас-

полагаются рядами (по типу строчки «елочка») на выступающих частях складок постсинаптических мембран. Вне нервно-мышечных соединений такие частицы обнаруживаются крайне редко [32, 33]. Сходные частицы имеются в постсинаптических мембранах электрических пластин скатов *Torpedo* [34, 35] и *Narcine* [36, 37], причем взаиморасположение частиц не упорядочено. У обоих видов эти частицы расположены в глубоких впячиваниях и в межтерминальных областях, а у *Narcine* — и в выростах между нервными окончаниями. На тонких срезах концевых пластинок амфибий также обнаруживаются «гранулированные элементы» с диаметром 6,0—12,0 нм, локализация которых ограничена выступами складок постинаптических мембран [38].

## III. КОЛИЧЕСТВО И ПЛОТНОСТЬ УПАКОВКИ

В каждой концевой пластинке нормальной мышцы расположено от десяти до двадцати миллионов молекул рецепторов. Плотность их упаковки на выступах складок постсинаптической мембраны составляет примерно 10 000 молекул на 1 мкм². В электрических органах плотность упаковки этих молекул равна ~5000 на 1 мкм² суммарной постсинаптической поверхности. Денервация мышц приводит к значительному (10—20 раз) повышению количества рецепторов вне концевых пластинок. Общее содержание рецепторного белка варьирует от нескольких нмоль на 1 кг ткани в иннервированных мышцах до примерно 1 мкмоль на 1 кг ткани в электрических органах *Narcine*.

Эксперименты по картированию поверхностной чувствительности к АХ нормальных и денервированных мышечных клеток давали основания полагать, что количество рецепторов в области концевой пластинки сопоставимо с их количеством на остальной части клеточной поверхности. Однако количественных данных о содержании рецепторных молекул в различных тканях получить не удавалось вплоть до введения в методический арсенал аффинных лигандов и привлечения морфологических методов (фрагментации замораживанием, приготовления тонких срезов, негативного окрашивания), позволяющих непосредственно измерять количество рецептороподобных структур в постсинаптических мембранах. Следует подчеркнуть, что, хотя морфологические методы и дают возможность однозначно определять количество таких структур, изучение связывания аффинных лигандов позволяет измерять не количество рецептороподобных структур, а число мест связывания лиганда. В следующих разделах эти связывающие места будут именоваться местами связывания токсина или местами связывания АХ. Как будет показано ниже, существующие данные свидетельствуют о том, что на каждую рецепторную молекулу приходится от двух до четырех мест связывания АХ или токсина («рецепторов»).

Что касается истории вопроса, то первые количественные сведения о никотиновых рецепторных молекулах были получены при изучении связывания $^{14}$C-d-тубокурарина диафрагмальными мышцами мышей [39]. Данный метод оказался удобным для исследования иннервированных мышц, поскольку он давал возможность сравнить количество обратимо связываемого лиганда в области концевых пластинок (где лиганд находится и в связанной, и в свободной форме) и в лишенных рецепторов участках, расположенных вне концевых пластин (где весь лиганд находится, по-видимому, в свободной форме). Естественно, что применить этот метод к денервированным мышцам было невозможно, поскольку в данном случае рецепторы распределены по поверхности мышечных волокон гораздо равномернее. Последующие фармакологические исследования показали, что связывание радиоактивного декаметония фрагментами мембран электрических органов угрей частично определяется связыванием рецепторами [40]; количество рецепторов, однако, не было точно измерено. В более поздних работах было установлено, что связывание декаметония и аналогичных лигандов фрагментами изолированных мембран ряда электрических органов пропорционально (коэффициент пропорциональности 1—2) связыванию радиоактивного АХ и токсинов [41, 42]. Специфическое связывание радиоактивных производных сульфгидрильных реагентов, способных изменять чувствительность рецепторов к АХ, также было пропорционально (с коэффициентом пропорциональности 1—2) связыванию α-нейротоксинов [13, 42]. Впервые количество мест связывания АХ в электрических тканях было точно измерено с помощью радиоактивного АХ [9, 41]; и в этом случае количество связывающих мест (~1 мкмоль на 1 кг электрической ткани у *Torpedo*) соответствовало результатам определения связывания α-бунгаротоксина в той же ткани [43].

Правомерность использования α-бунгаротоксина была доказана экспериментами Ли [44], и в особенности той работой Ли, Ценга и Чиу [25], в которой было показано, что связывание радиоактивного токсина нормальными мышцами диафрагмы крыс приходится на область концевых пластинок, в денервированных же мышцах связывание обнаруживается на гораздо большей части поверхности мышечных волокон. Множество экспериментов, проведенных с тех пор в различных лабораториях, подтвердило этот факт: область локализации связывающих мест для ряда токсинов в различных тканях хорошо совпадает с расположением постсинаптических мембран. Количество этих мест достигает нескольких десятков миллионов на концевую пластинку нормальной мышцы (например, в диафрагме мыши и в портняжной мышце лягушки — около 30 млн., в диафрагме крысы — 40 млн.) [21—24, 28]. Исходя из этих измерений и учитывая, что на рецепторную молекулу приходится 2—4 места связывания токсина (см. ниже), можно

рассчитать количество рецепторно-канальных молекул, приходящееся на одну концевую пластинку. В большинстве мышц это число равно 10—20 млн. По данным наиболее четко выполненных экспериментов [28, 45], в одной концевой пластинке портняжной мышцы лягушки содержится 10 млн. рецепторных молекул.

Средняя плотность упаковки мест связывания токсинов равна приблизительно 10 000 на 1 мкм$^2$ поверхности постсинаптической мебраны [21—24, 28, 29, 43]. Но если учесть, что, согласно последним данным, на которых мы уже останавливались, токсин концентрируется лишь на выступающих частях складок постсинаптических мембран, то можно ожидать, что плотность упаковки токсиновых мест на этих выступах достигает 20 000—30 000 на 1 мкм$^2$. После денервации мышц наблюдается постепенное повышение количества токсиновых мест. Затем устанавливается равновесие, определяемое, с одной стороны, увеличением количества мест связывания токсинов, приходящихся на единицу поверхности мембраны, и, с другой стороны, уменьшением общей поверхности мышечных волокон в результате их атрофии [21]. За один день количество связывающих мест удваивается; максимальный уровень, достигаемый через 2—3 нед, превышает нормальный в 10—20 раз [21, 22, 24]. До сих пор не удалось строго показать, что между содержанием мест связывания токсинов и чувствительностью к АХ существует количественная зависимость. Тем не менее ясно, что, во-первых, с появлением новых мест связывания чувствительность к АХ возрастает и, во-вторых, очень сильно возрастает количество мест связывания токсинов вне нервно-мышечных соединений. К настоящему времени не удалось также обнаружить избытка мест связывания токсинов на концах нормальных мышечных волокон, обладающих значительной чувствительностью к АХ [19].

В некоторых нормальных мышцах, например в портняжной мышце лягушки, общее количество токсиновых мест вне нервно-мышечных контактов значительно превышает их содержание в самих концевых пластинках [21, 31]. Эти расположенные вне концевых пластин места связывания токсинов могут быть частично защищены АХ или d-тубокурарином; после солюбилизации мышечных мембран они ведут себя подобно рецепторам [21]. Возможно, что эти места представляют собой рецепторы, содержание которых подвержено определенным, вероятно сезонным, колебаниям. Такие колебания могли бы иметь место, если бы происходила спонтанная частичная денервация мышц. Непонятно также, почему при использовании высоких концентраций α-бунгаротоксина метятся белковые молекулы диафрагмальных мышц крыс, локализующиеся вне нервно-мышечных соединений. После солюбилизации мышечных мембран комплексы этих молекул с токсином сохраняются [46]. По скорости седиментации и поведению при гель-фильтрации эти комплексы существенно отличаются от комплексов из концевых пластинок. До сих вопрос о взаимосвязи

мест связывания, расположенных вне нервно-мышечных соединений, и никотиновых рецепторов концевых пластин остается нерешенным. Здесь уместно отметить, что сильное $^3$H-ацетилирование α-бунгаротоксина приводит к значительному повышению его неспецифического связывания [47]. По-видимому, этот феномен как раз и явился одной из причин ошибочного обнаружения большого количества специфических связывающих мест для α-бунгаротоксина в ткани мозга [48].

В электрических органах количество синаптических контактов и, следовательно, общая поверхность постсинаптических мембран гораздо больше, чем в мышцах. Поэтому и количество мест связывания в электрических органах намного превышает их содержание в мышцах. По результатам измерений связывания змеиных α-нейротоксинов концентрация связывающих мест в мышечной ткани составляет 1—5 нмоль на 1 кг, в электрической ткани угрей — около 75 нмоль на 1 кг, а в электрических органах скатов *Torpedo* и *Narcine* — 1 и 2 мкмоль на 1 кг сырого веса ткани соответственно [11, 36, 49]. Вычисления, основанные на данных о суммарном количестве мест связывания и суммарной площади постсинаптических мембран, показывают, что плотность упаковки мест связывания токсинов в электрических тканях скатов составляет величину порядка 10 000 мест на 1 мкм² [43], т. е. близка к плотности упаковки в мышцах. По данным электронно-микроскопической радиоавтографии плотность упаковки мест связывания токсинов в электрической ткани угрей в 2—3 раза выше [29].

Исследование постсинаптических мембран в различных тканях с помощью электронной микроскопии привело к появлению других способов определения количества рецепторных молекул. На гребнях складок постсинаптических мембран нормальных мышц обнаружены внутримембранные частицы (фрагментирование замораживанием [32, 33]) или глобулы (тонкие срезы [38]), плотность упаковки которых равна примерно 10 000 на 1 мкм². Сходные частицы, диаметр которых также колеблется от 7,0 до 14,0 нм, можно наблюдать в электрических тканях *Torpedo* и *Narcine* после фрагментации целостных постсинаптических мембран. Плотность упаковки этих частиц равна приблизительно 5000 на 1 мкм². Во вненейрональных областях (во впячиваниях под нервными окончаниями и в случае *Narcine* в выпячиваниях постсинаптической мембраны между нервными окончаниями) распределение частиц носит, по-видимому, случайный характер. Несмотря на то что при использовании фрагментации замораживанием иногда удается обнаружить фрагменты с близкорасположенными частицами, а при использовании тонких срезов выявляется полурегулярное взаиморасположение глобул, истинную решетчатую структуру, которую образовывали бы частицы, до сих пор никто не наблюдал. Дальнейшие сведения о плотности упаковки предполагаемых рецепторных молекул были получены с помощью негативного окра-

шивания изолированных постсинаптических мембран [37, 50, 68]. Мембранные везикулы, выделенные из гомогенатов электрической ткани *Narcine*, обладают высокой связывающей способностью для токсина. При обычном окрашивании контуры этих частиц (в виде кольца?) едва различимы. Однако вывернутые везикулы с местами связывания токсинов, обращенными внутрь, выглядят в виде четко очерченных сфер, плотность упаковки которых составляет приблизительно 5000 на 1 мкм² [37, 50]. Сокращение постсинаптической мембраны во время негативного окрашивания может служить препятствием для таких измерений. Но этого можно избежать, если перед окрашиванием произвести фиксацию мембран. Следует подчеркнуть, что в настоящее время идентичность внутримембранных структур постсинаптических мембран и рецепторных молекул не доказана. Эти структуры могут быть и молекулами активируемой калием — натрием АТФазы, и (или) каналами для других ионов [37]. Если учесть, однако, что по существующим данным на одну молекулу очищенного рецепторного белка из электрических тканей приходится от двух до четырех мест связывания токсинов, то корреляция между плотностью упаковки токсиновых мест (10 000 на 1 мкм² в электрических тканях и 20 000—30 000 на 1 мкм² в мышцах) и концентрацией внутримембранных частиц (5000 на 1 мкм² в электрических тканях и 10 000 на 1 мкм² в мышцах) кажется неслучайной.

До сих пор морфологическими методами не удалось измерить количество рецепторных молекул вне зоны концевой пластинки в мышцах и электрических тканях. Это обусловлено отсутствием четких данных о том, что внутримембранные частицы с низкой плотностью упаковки действительно представляют собой рецепторные молекулы.

Установлено, что в нервно-мышечных соединениях количество мест связывания токсина и количество мест связывания диизопропилфторфосфата практически одинаково [28]. С другой стороны, суммарное количество токсиновых участков в электрической ткани *Torpedo* и *Narcine* очень близко к количеству активных центров холинэстеразы [43, 49, 50]. Приведенные данные позволяют думать, что между молекулами холинэстеразы и молекулами рецепторов в концевых пластинках имеется определенное соответствие. В связи с этим можно отметить, что, согласно последним данным, на рецепторную молекулу приходится, видимо, от двух до четырех молекул токсина, а одна молекула холинэстеразы имеет четыре места связывания диизопропилфторфосфата [51]. Одно из вероятных объяснений такого совпадения количества молекул эстеразы и рецепторов основывается на результатах морфологических исследований концевых пластинок у амфибий и дождевых червей [38]. В этих случаях глобулы диаметром 6,0—12,0 нм располагаются в постсинаптических мембранах в определенной мере упорядоченно; плотность их упаковки равна приблизительно

5000 на 1 мкм². Каждая глобула прикреплена посредством длинной ножки к трудновыявляемой крупной глобулярной структуре, находящейся внутри синаптической щели. С другой стороны, из синаптических щелей активно работающих мышц (ср. [52]) и из способных связывать токсин изолированных мембран электрических тканей (см. например, [49]) можно выделить холинэстеразу: полученные из электрических тканей угрей молекулы холинэстеразы после негативного окрашивания выглядят в виде головок с четырьмя субъединицами и прикрепленным к ним хвостом [53]. На этом основании можно предположить, что молекулы холинэстеразы каким-то образом непосредственно соединены с рецепторными молекулами. Во всяком случае, данные о постоянстве соотношения количеств холинэстеразы и рецепторов свидетельствуют о существовании общего механизма регуляции содержания молекул рецепторов и ферментов. Следует сказать, однако, что количество молекул эстеразы может и отличаться от количества рецепторов. Например, активность фермента в электрических тканях угрей и скатов *Torpedo* одинакова, а количество связывающего токсин материала в ткани угрей составляет менее одной десятой от его количества у *Torpedo* [49]. Твердо установлено также, что после денервации мышц млекопитающих концентрация холинэстеразы в области концевых пластин и в остальных частях мышцы в течение нескольких дней быстро снижается и остается на низком уровне [54]; в то же время концентрация рецепторного белка возрастает в 10—20 раз.

При сравнении концентрации мест связывания токсинов в гомогенате мышечной ткани и количества доступных мест связывания на поверхности той же интактной мышцы оказалось, что большая часть мест связывания (20—30% от суммарного количества токсиновых мест в ткани) находится внутри мышечных волокон. Из экспериментов с необратимой блокадой наружных, связанных с мембраной токсиновых мест связывания создается впечатление, что внутриклеточный материал, связывающий токсин, включается с постоянной скоростью в состав мембран. При этом связывающий материал поступает в форме, способной комплексироваться с токсинами, наносимыми снаружи клеток [24]. Приведенные данные указывают на постоянное обновление популяции рецепторно-канальных молекул. Эксперименты по удалению комплексов рецепторов с токсином из мембран диафрагмальной мышцы крыс показывают, что период полузамещения рецепторных молекул составляет много дней и что для этого процесса необходим синтез белка. В денервированных мышцах наблюдается совсем другая картина: в таких мышцах оборот токсин-рецепторных комплексов в участках, отличных от нервно-мышечных соединений, происходит с полупериодом менее 1 дня [52].

Долгое время думали, что включение активных рецепторных молекул в состав мышечных мембран зависит от присутствия ней-

ронов вблизи мышечных клеток, их соприкосновения или образования синапсов. Использование радиоавтографии с применением электронной и световой микроскопии показало, однако, что в культуре клеток эмбриональной мышечной ткани имеются в небольшой концентрации токсиновые места, распределенные по всей поверхности клеток и образующие иногда случайные скопления (см., например, [56]). Более того, блокада связывания токсина на поверхности неиннервированных мышц α-бунгаротоксином [56] или d-тубокурарином [57] не препятствует формированию новых нервно-мышечных соединений, а присутствие нефункционирующих, но во всех других отношениях, видимо, нормальных нервно-мышечных соединений не мешает рассредоточению чувствительности вдоль неактивных мышечных волокон [58]. Большая часть полученных к настоящему времени данных указывает на независимость процесса включения рецепторов в мембрану от нервной передачи как таковой.

## IV. СВОЙСТВА РЕЦЕПТОРОВ КАК БЕЛКОВ

Имеющиеся морфологические, биохимические и физиологические данные об ацетилхолиновых рецепторно-канальных молекулах соответствуют модели, согласно которой эти молекулы представляют собой интегральные мембранные гликопротеиды, насквозь пронизывающие постсинаптическую мембрану. Каждая такая молекула содержит, видимо, около восьми субъединиц, объединенных таким образом, что их гидрофобные части ориентированы наружу, обеспечивая растворение молекулы в мембране, а гидрофильные области обращены внутрь, образуя гидрофильное ядро. Из этих восьми субъединиц четыре с молекулярным весом около 42 000 связывают АХ, змеиные α-нейротоксины и другие аффинные лиганды, причем связывание происходит на тех частях субъединиц, которые обращены в синаптическую щель. При низких концентрациях АХ в его связывании и (или) задержке может наблюдаться кооперативность. В состав рецепторных молекул входят также более крупные субъединицы трех других типов. Суммарный молекулярный вес рецепторов равен, по-видимому, около 450 000. Структура выявленных молекул соответствует ожидаемой для канальных молекул.

### А. Растворимость

Связывающий бунгаротоксин белок из поперечнополосатых мышц позвоночных в водной среде растворить не удается. Ни добавление солей (до 60% насыщения сульфата аммония [59]) и кальций-хелатирующих соединений, ни механическое перемешивание различной интенсивности, включая длительное озвучивание [21, 22, 43, 60], не приводили к растворению этого белка в водной

фазе. Рецепторные молекулы, таким образом, ведут себя как крайне гидрофобные соединения. В сходных условиях холинэстераза выделяется из мышечной и электрической тканей. Для этого требуется механическое перемешивание в присутствии высоких концентраций солей. В частности, для растворения практически всей эстеразы электрической ткани угрей достаточно 5%-ного раствора сульфата аммония (см. [53]). Обработка интактных мышц коллагеназами, содержащими примеси протеаз, или же самими протеазами также оказывается достаточной для удаления холинэстеразы из области концевых пластинок. Чувствительность же рецепторно-канальных молекул к АХ при этом существенно не меняется [52]. Однако белок, связывающий бунгаротоксин, можно легко отделить от мембран с помощью практически любого детергента [6—13] или соответствующим образом подобранных смесей спиртов, которые обладают рядом свойств детергентов [60]. Приведенные данные показывают, что в отличие от активной холинэстеразы рецепторные молекулы прочно встроены в постсинаптическую мембрану. Поэтому при биохимических исследованиях, проводимых с рецепторами из тканей позвоночных, следует поддерживать такую концентрацию детергента, которая достаточна для насыщения всех мест рецепторной молекулы молекулами детергента; удаление детергента приводит к агрегации и часто к преципитации рецепторных молекул [49, 62, 63].

Интересно, что связывающие бунгаротоксин белки из тканей беспозвоночных, особенно из мозга мух [9] и головоногих [61], обладающие всеми теми фармакологическими свойствами, которые характерны для белков из поперечнополосатых мышц и электрических тканей позвоночных, могут быть легко проэкстрагированы солевыми растворами при относительно нейтральных значениях pH. Комплексы белка с токсином из этих источников представляли для исследователей особый интерес, поскольку их молекулярный вес можно было определить общепринятыми биохимическими методами с большей точностью, чем молекулярный вес покрытых детергентом комплексов из тканей позвоночных.

### Б. Молекулярный вес, включая размеры субъединиц

Молекулярный вес рецепторно-канальных молекул из тканей позвоночных был определен четырьмя способами: первый—обычные биохимические определения (скорости седиментации, радиусы Стокса, плотности с поправками на связанный детергент); второй—кондуктометрия; третий — седиментационное равновесие; четвертый — электрофорез в полиакриламидном геле после сшивки субъединиц молекулы в единое целое.

В более ранних исследованиях использовался в основном первый способ. После растворения детергентами мембран, связывающих токсин, было обнаружено несколько различных агрегатов

тройных комплексов детергент — токсин — белок (см., например, [49]). Все исследователи находили, что наибольшая часть этих агрегатов седиментирует в градиенте концентрации сахарозы медленнее (9,3 S) фермента каталазы, мол. вес которой равен 240 000 [6—13, 21, 62—65]. Для сравнения укажем, что белково-токсиновый комплекс, выделенный из головного ганглия головоногих моллюсков, седиментировал чуть медленнее (11 S) каталазы; это позволяло думать, что мол. вес комплекса близок к 240 000 [61]. Все исследователи отмечали также, что при гель-фильтрации детергент-токсин-рецепторные комплексы из электрических тканей ведут себя так, словно радиус Стокса у них близок к радиусу Стокса β-галактозидазы из *E. coli*, мол. вес которой составляет примерно 550 000. Комплексы же токсина с белком из головного ганглия головоногих моллюсков элюируются с геля в объеме, соответствующем радиусу Стокса каталазы. Когда затем для измерения молекулярного веса был применен осмометрический метод [96], стало ясно, что по крайней мере токсинсвязывающая часть рецепторной молекулы имеет мол. вес около 250 000.

Позднее было обнаружено, что введение ингибиторов протеаз в процессе очистки белка приводит к существенному увеличению молекулярного веса выделенных молекул. Для получения воспроизводимых результатов при изучении субъединичного состава с помощью электрофореза в полиакриламидном геле оказалось необходимым также добавлять агенты, предотвращающие сшивку субъединиц рецепторов под действием тканевых факторов. В присутствии этилендиаминтетраацетата и фенилметилсульфонилфторида, ингибирующих протеазы [63, 96], и *трис*-буфера, подавляющего сшивку субъединиц [69], рядом исследовательских групп было выявлено существование четырех различающихся по размерам типов субъединиц (с мол. весом около 42 000, 48 000, 59 000 и 65 000) рецепторных молекул из *Torpedo* [96] и *Narcine* [69]. Молекулярный вес целой рецепторной молекулы по данным электрофореза в полиакриламидном геле после сшивки субъединиц равен около 400 000. Метод седиментационного равновесия дал для белка из *Narcine* [69] несколько большую величину мол. веса — около 500 000.

Точное число субъединиц каждого типа в составе рецепторной молекулы пока не установлено. В настоящее время на основании приведенных выше данных о молекулярном весе и сведений, представленных в разд. Д и Е, можно предполагать, что в состав рецепторной молекулы входят четыре субъединицы с молекулярным весом 42 000, по одной субъединице каждого из других типов и по крайней мере еще одна субъединица из числа трех более крупных. Таким образом, рецепторная молекула состоит приблизительно из 8 субъединиц.

## В. Аминокислотный состав

Многим исследователям к настоящему времени удалось получить чистые или почти чистые рецепторные белки из электрических тканей и определить их аминокислотный состав [62, 63, 65, 66, 69]. Пожалуй, наиболее важным итогом проделанной работы явилось установление факта сходства аминокислотного состава рецепторных и водорастворимых белков, несмотря на то что поверхность рецепторов крайне гидрофобна. Состав рецепторов заметно отличается от состава активной холинэстеразы. Химический анализ показывает также, что в рецепторные молекулы входят сахара [7], и в частности манноза. Установлено, что рецепторный белок может адсорбироваться на аффинных колонках, содержащих в качестве лиганда конканавалин А; десорбция достигается добавлением α-метил-D-маннозида [69]. Все субъединицы очищенного рецепторного белка после разделения в полиакриламидном геле окрашиваются красителями на сахара [69]. Таким образом, рецепторный белок можно рассматривать как гликопротеид. Известно, что сахара прикрепляются к белкам лишь с наружной поверхности клеток. Поэтому вполне вероятно, что углеводный компонент рецепторных молекул расположен в синаптической щели. Но, с другой стороны, нейраминидаза не оказывает существенного влияния на функционирование рецепторных молекул в условиях in situ [17].

## Г. Изоэлектрическая точка

По данным многих исследователей, изоэлектрическая точка рецепторных молекул, свободных от токсина или находящихся в комплексе с ним, составляет примерно 5, что указывает на сильно кислый характер этих белков [6—13, 37, 62—66]. Интересно, что α-бунгаротоксинсвязывающий белок из денервированных мышц обладает несколько более низкой изоэлектрической точкой по сравнению с белком из зоны концевых пластинок тех же самых мышц, но с сохраненной иннервацией. Таким образом, между рецепторными молекулами иннервированных и денервированных мышц имеется определенное различие [52].

## Д. Количество участков связывания ацетилхолина на молекулу

При работе с рецепторными белками из различных электрических тканей многими группами исследователей отмечалось, что наиболее чистые препараты белка связывают 1 моль змеиного α-нейротоксина на 80 000—150 000 г общего количества белка [6—13, 49, 63—66, 69]. По самым последним данным эта величина равна 90 000—120 000 г. Поскольку молекулярный вес рецепторов, по-видимому, равен около 450 000, полученные результаты указывают

на наличие в рецепторной молекуле четырех мест связывания токсина. К такому же выводу пришли некоторые исследователи, работавшие с АХ: по этим данным на 1 моль связанного АХ также приходится 80 000—120 000 г очищенного рецепторного белка [66, 69]. Другие авторы не обнаружили равенства токсиновых и ацетилхолиновых мест связывания; по их мнению, на каждый участок АХ приходится два токсиновых места. В пользу последнего предположения говорит также тот факт, что на одно связывающее место для специфического сульфгидрильного аффинного лиганда ацетилхолиновых рецепторов приходится около двух токсиновых мест [70]. Следует отметить, что при проведении подобного рода измерений возникает ряд трудностей, в том числе проблемы, связанные с кооперативными взаимодействиями между рецепторами, и изменения связывающих свойств рецепторов в процессе их очистки. Ясно, что для решения вопроса о равенстве или неравенстве числа токсиновых и ацетилхолиновых мест связывания необходимы дальнейшие исследования; кроме того, не исключена возможность существования видовых различий.

Величина константы диссоциации взаимодействия АХ с рецепторно-канальными молекулами, находящимися в составе постсинаптических мембран, по данным, полученным во многих лабораториях, близка к $10^{-6}$ М. В то же время очищенные рецепторы, по некоторым данным, обладали сродством к АХ, в 10—100 раз более низким [7, 62, 66, 69]. В последующих исследованиях эти результаты, по всей вероятности, будут уточнены. Неоднократно наблюдался феномен кооперативности в связывании и (или) в задержке АХ мембранными препаратами. Однако в наиболее очищенных препаратах эффект кооперативности, по-видимому, отсутствует (см. ниже). Следует подчеркнуть [12], что к настоящему времени ни в одной работе кооперативное связывание (облегчение связывания АХ одним рецептором после взаимодействия АХ с другим рецептором) не было отдифференцировано от кооперативной задержки (замедление диссоциации АХ после двух или большего числа независимых или взаимооблегчающих взаимодействий, происходящее, возможно, за счет конформационных изменений рецепторной молекулы).

## Е. Структура активного центра

Не считая данных, полученных в фармакологических исследованиях, согласно которым роль агонистов могут выполнять многие четвертичные аммонийные аналоги АХ, о структуре связывающих АХ мест рецепторных молекул в настоящее время известно удивительно мало. Однако благодаря новому подходу к изучению рецепторов, предложенному Карлином и др. [13, 42] и широко используемому теперь во многих других лабораториях, некоторые сведения относительно мест связывания АХ получить все же удалось.

В этих работах было установлено, что редуцирующие агенты типа дитиотрейтола заметно снижают влияние холиномиметиков на рецепторы мышечных и электрических тканей; это ингибиторное действие может быть снято в присутствии ряда окислителей. По всей вероятности, редуцирующие соединения действуют на S—S-мостики в рецепторных молекулах, разрывая их и образуя SH-группы. Но, что особенно интересно, механизм, обеспечивающий физиологический ответ, в заблокированном (восстановленном) состоянии оказывается чувствительным к алкированию свободных SH-групп соединениями типа бромацетилхолина, действующими в этом случае подобно перманентным агонистам. Возможно, подобное действие обусловлено вращением данных соединений вокруг осей, образуемых их связями с рецепторами, что приводит к многократной активации рецепторов четвертичными аммонийными группами. Но и в этом случае действие ковалентно связанного АХ может быть конкурентно ингибировано d-тубокурарином — точно так же, как и в обычных условиях. Рецепторы в заблокированном состоянии способны также очень интенсивно алкилироваться производными N-этилмалеимида, имеющими четвертичную аммонийную группу, которая находится на расстоянии около 1 нм от реактивной двойной связи. Это особенно характерно для иодида 4-(N-малеимид)-бензилтриметиламмония. Агонисты и антагонисты, включая α-нейротоксины, препятствуют этой реакции. При повторном окислении восстановленных рецепторов электрических тканей аффинным реагентом $^{3}$H-4-(N-малеимид)-бензилтриметиламмонийиодидом тритий оказывается связанным с субъединицами рецепторных молекул, имеющими мол. вес 42 000. Полученные результаты дают основание думать, что в состав никотиновых рецепторов того типа, который обнаруживается в скелетных мышцах и в электрических тканях, входят существенные для функционирования рецепторов S—S-мостики. Эти мостики расположены на расстоянии 1 нм от места, взаимодействующего с четвертичной аммонийной группой агонистов. С другой стороны, приведенные данные служат доказательством локализации мест связывания АХ на субъединицах рецепторов с молекулярным весом 42 000. Восстановление S—S-связей, по-видимому, вызывает конформационную перестройку рецепторов. Об этом свидетельствуют такие факты, как потеря гексаметонием антагонистических свойств и приобретение свойств агониста, снижение кооперативных эффектов карбахола.

## Ж. Структура каналов

Результаты физиологических исследований показывают, что открытие и закрытие каналов постсинаптических мембран для натрия и калия стимулируется АХ в считанные миллисекунды. Это указывает на очень тесный контакт рецепторных и канальных структур, что может иметь место в том случае, если эти структуры

связаны с одной и той же молекулой. Имеются, однако, и прямые доказательства того, что выделенный никотиновый рецепторный белок имеет структуру, которой должны обладать канальные молекулы. Кроме того, этот белок после его введения в состав искусственных мембран и ведет себя как канальная молекула. Данные, касающиеся структуры рецепторно-канальных молекул, обсуждаются в этом разделе; дополнительные сведения будут представлены также в разд. V, A.

Канальная молекула, по предположению Сингера [71], должна представлять собой цилиндр, насквозь пронизывающий мембрану и построенный из радиально расположенных субъединиц. Вдоль цилиндра проходит центральный ствол, способный пропускать ионы. Для того чтобы подобный белок мог растворяться в мембране, он должен обладать очень гидрофобной поверхностью. Солюбилизировать такой белок можно лишь при помощи детергентов — ситуация, действительно имеющая место в случае никотиновых рецепторных молекул. Центральный ствол канальной молекулы, однако, должен быть сильно гидрофильным, поскольку через него должны проходить ионы. Поэтому аминокислотный состав канальной молекулы должен быть близким к составу водорастворимых белков. Именно таким аминокислотным составом и обладает никотиновый рецепторный белок.

Фрагментирование замораживанием целостной электрической ткани *Narcine* выявило наличие крупных внутримембранных частиц с диаметром 7,0—14,0 нм. Эти частицы значительно выступают над обоими слоями мембраны, что может служить указанием на присутствие белковых молекул, начинающихся на одной стороне мембраны, пронизывающих ее насквозь и выходящих на другую сторону [36, 37]. Плотность упаковки частиц, остающихся после фиксации мембран во внутреннем («А») слое, составляет около 5000 на 1 мкм$^2$. Эти частицы, как было показано, могут быть разделены на три типа в соответствии с их размерами. В отсутствие фиксации частицы равномерно распределены между внутренним и наружным («В») слоями, причем для частиц, находящихся в наружном слое, характерны тот же порядок расположения и то же распределение по размерам, что и для частиц внутреннего слоя. На концах по крайней мере некоторых частиц со стороны и внутреннего, и наружного слоя обнаруживаются углубления, что указывает на возможное присутствие белковых субъединиц, окружающих сердцевину, ориентированную перпендикулярно поверхности мембраны.

Негативное окрашивание связывающих токсин везикул, полученных из постсинаптических мембран электрических тканей [36, 37, 50, 68], показывает, что связывающая токсин поверхность (наружная, обращенная к синаптической щели) покрыта слабоочерченными, едва различимыми структурами (в форме колец?). Вторая, цитоплазматическая поверхность усеяна хорошо различимыми

кольцеобразными структурами, состоящими из нескольких субъединиц, располагающихся вокруг центрального углубления. Диаметр таких колец равен около 6,0 нм, а плотность упаковки — около 5000 на 1 мкм$^2$. Внешний вид и размеры рецепторных белковых молекул, выделенных аффинной хроматографией и подвергнутых негативному окрашиванию, оказываются точно такими же, как вид и размеры хорошо различимых кольцеобразных структур везикул [37, 50, 62]. Создается впечатление, что эти четко выявляемые на внутренней поверхности мембраны кольцевые структуры связаны с местами связывания токсинов, расположенными на наружной поверхности мембраны.

Размеры отдельных субъединиц рецепторов вполне достаточны для того, чтобы каждая из субъединиц могла перекрыть всю толщу постсинаптической мембраны. Вычисления, основанные на допущении о цилиндрической форме рецепторных субъединиц, показывают, что если плотность субъединицы равна 1,33, мол. вес — 42 000, а диаметр — 2,0 нм, то длина такой частицы составляет 13,6 нм [68]. В условиях, когда с помощью негативных красителей вызывается сокращение постсинаптических мембран, максимальная плотность упаковки кольцевых структур достигает 15 000 на 1 мкм$^2$. При этом максимальный диаметр рецепторных молекул в любой точке постсинаптической мембраны не превышает 9,0 нм. Ясно, что для определения количества, взаимной ориентации и трансмембранного расположения субъединиц рецепторных молекул предстоит еще очень много сделать.

## V. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что АХ действует на выступающие из наружной поверхности клеток концы рецепторных молекул и вызывает конформационную перестройку в структуре одной — четырех субъединиц этих молекул. В результате на несколько миллисекунд открываются каналы для небольших катионов (ионов натрия, калия и в некоторой степени кальция), что обеспечивает прохождение нескольких десятков тысяч ионов за одну миллисекунду. В этот период АХ, вероятно, остается в комплексе с рецептором. Те молекулы АХ, которые не связались с рецепторами, а также молекулы, которые уже покинули рецепторные места, немедленно гидролизуются холинэстеразой (если отсутствует ингибитор холинэстеразы). После активации рецепторные молекулы теряют чувствительность к АХ. Это особенно ярко проявляется, когда в синаптической щели присутствует в высокой концентрации агонист. Длительность эффектов различимых аналогов АХ на проводимость каналов различна. Места связывания АХ конкурентно ингибируются антагонистами типа d-тубокурарина, а α-нейротоксины блокируют места связывания АХ по неконкурентному типу и необратимо.

## А. Места связывания ацетилхолина

Поскольку в состав АХ входит четвертичная аммонийная группа, то вряд ли молекулы АХ могут быстро проникать через постсинаптическую мембрану. Скорее всего они действуют лишь на те структуры рецепторных молекул, которые обращены в сторону синаптической щели. Эксперименты с заполненными АХ микроэлектродами показывают, что деполяризация возникает лишь в том случае, когда АХ вводят снаружи, а не внутрь мышечной клетки. Аналогичным образом d-тубокурарин эффективно ингибирует индуцируемое АХ возбуждение лишь тогда, когда его вводят внеклеточно в область концевой пластинки мышечного волокна, но не в само волокно [1, 72].

## Б. Минимальный размер каналов

Индуцируемое АХ увеличение проницаемости постсинаптической мембраны относится прежде всего к ионам натрия и калия, хотя затрагивает также и ионы кальция ([4, 20], см. также [12]). Через открывающиеся каналы могут также проходить небольшие органические катионы, включая ионы аммония, метиламмония, этиламмония, гидразония и в меньшей степени тетраэтиламмония, триметилэтиламмонийхолина и диметилдиэтаноламмония. В дегидратированном состоянии бóльшая часть этих ионов способна проходить через поры диаметром около 0,3 нм. Поэтому в качестве минимального размера каналов можно принять эту величину. Хотя возможны и другие механизмы обеспечения ионной избирательности, обычно полагают, что ионные каналы концевых пластинок содержат, по крайней мере на определенном своем участке, область с таким диаметром.

## В. Регуляция каналов и скорость потока ионов

Несколько групп исследователей обнаружили, что при ионнофоретической аппликации на скелетную мышцу АХ и других сходных деполяризующих агентов или при погружении мышцы в раствор с этими соединениями наблюдается увеличение «шумового» тока через постсинаптическую мембрану [73—77]. Подобного «шума» не возникает, однако, при прямом пропускании тока между внутриклеточно расположенным микроэлектродом и внеклеточной жидкостью, которое вызывает деполяризацию такой же глубины, что и при действии АХ. Поэтому полагают, что «шум» является отражением элементарных актов деполяризации, вызываемых АХ, которые, суммируясь, и определяют конечную деполяризацию. Предполагается далее, что подобные элементарные акты сводятся к открытию и закрытию отдельных каналов. Продолжительность этих актов можно рассчитать на основе анализа ам-

плитудного спектра «шума», предполагая, что изменения «шумового» тока должны соответствовать частоте элементарных актов деполяризации и соответственно их длительности. Проведенный анализ показал, что продолжительность каждого элементарного изменения в проницаемости, отражающая, по всей вероятности, длительность функционирования одного канала, составляет около 1 мс при 20° С. Было найдено, что величина элементарного изменения проводимости равна $0{,}3 \cdot 10^{10}$—$1 \cdot 10^{10}$ См. Отсюда можно вычислить, что в условиях потенциала покоя при 20° С каждый элементарный акт сопровождается переносом через постсинаптическую мембрану суммарного заряда, эквивалентного примерно $2 \cdot 10^4$—$5 \cdot 10^4$ одновалентных ионов за 1 мс. В момент максимального развития потенциала концевой пластинки портняжной мышцы лягушки открыто приблизительно 135 000 каналов [77].

Точная величина продолжительности элементарного акта изменения проницаемости остается неизвестной. Некоторые факты позволяют, однако, думать, что каждый такой акт осуществляется по принципу «все или ничего» (т. е. в тот период, когда канал открыт, его проводимость остается на постоянном уровне), а длительность такого акта для различных каналов подчиняется законам вероятностного распределения [77—79]. Установлено, что скорость закрытия каналов зависит от температуры и от величины трансмембранного потенциала: индуцированные АХ токи тем продолжительнее, чем выше отрицательный мембранный потенциал и ниже температура. Именно такую зависимость позволяет предсказать модель конформационных изменений рецепторных молекул, рассматривающая эти молекулы как простые диполи [78]. Блокада рецепторов α-бунгаротоксином десенсибилизирующими дозами АХ или кураре приводит к снижению частоты элементарных актов, не оказывая сколько-нибудь существенного влияния на их амплитуду и продолжительность [76, 77]. При действии же карбахола, декаметония и ацетилтиохолина, напротив, происходит укорочение периода функционирования каналов (по сравнению с наблюдаемым при действии АХ), а активация каналов под действием субэрилдихолина обусловлена удлинением периода активного состояния каналов [74, 80]. В связи с этим было высказано предположение, что длительность функционирования каналов связана с продолжительностью существования комплексов агонистов с рецепторами. Анализ «шумов» не только позволил выявить изменения в продолжительности активного состояния каналов, но и дал основания предположить, что аналоги АХ могут активировать каналы с различной проницаемостью [80]. Этот феномен можно было бы объяснить либо различиями в степени раскрытия отдельных каналов при наличии гомогенной популяции каналов, либо существованием нескольких различных популяций каналов. (В связи с этим уместно вспомнить, что измерение размеров внутримембранных частиц постсинаптических мембран электриче-

ской ткани *Narcine* позволило выявить наличие по крайней мере трех различных популяций таких частиц [37].) Снижение проницаемости каналов может, видимо, происходить и при восстановлении S—S-мостиков в молекулах рецепторов [81].

## Г. Судьба ацетилхолина в синаптической щели

Анализ мембранного потенциала и «шумового» тока показал, что и постоянная времени процесса прекращения элементарного акта проводимости (отождествляемая с постоянной времени закрытия каналов), и постоянная времени процесса угасания токов концевых пластинок всех типов при нормальной температуре и нормальном мембранном потенциале равны 1—1,5 мс. (При других температурных условиях и иных уровнях мембранного потенциала эти величины, как было обнаружено, могут быть и меньше 1 мс, и больше 10 мс.) Приведенные данные служат надежным доказательством того, что после выделения из нервных окончаний молекулы АХ имеют возможность связаться с рецепторами АХ в среднем лишь 1 раз [75, 82]. Таким образом, наличие холинэстеразы может рассматриваться как существенный признак синапсов, поскольку этот фермент позволяет АХ действовать лишь очень непродолжительное время. Важным следствием действия холинэстеразы, имеющим, видимо, прямое отношение к потере чувствительности, является следующее: в период, когда рецепторы и рецепторные молекулы возвращаются в исходное состояние после взаимодействия с АХ и активации каналов, молекулы АХ в синаптической щели, по всей вероятности, отсутствуют.

Уже давно известно, что ингибиторы холинэстеразы удлиняют действие АХ. Этот факт, очевидно, не связан с влиянием ингибиторов на рецепторно-канальные молекулы, поскольку многие эстеразные ингибиторы либо оказывают очень слабое действие на продолжительность элементарного акта изменения проницаемости, либо совсем не оказывают влияния [75]. В недавних экспериментах показано, что в условиях применения ряда ингибиторов эстераз или удаления холинэстеразы из синапсов с помощью коллагеназы продолжительность действия АХ на токи концевой пластинки увеличивается приблизительно в три раза [75, 82]. Этот факт можно, очевидно, объяснить тем, что, прежде чем покинуть синаптическую щель, негидролизованный АХ имеет возможность повторно связаться рецепторами (в среднем трижды). Интересно, что выход молекулы АХ из синаптической щели в присутствии ингибиторов холинэстеразы происходит значительно медленнее, чем можно было бы ожидать в случае простой диффузии [78]. По-видимому, это обусловлено именно повторным связыванием АХ рецепторными молекулами [75, 82]. Если данное предположение соответствует действительности, то снижение количества свободных рецепторов АХ под действием кураре, кобратоксина, α-бунгаротоксина или

снижение их чувствительности под действием больших концентраций АХ должно приводить к сокращению периода угасания токов концевой пластинки в присутствии простигмина. Результаты экспериментов полностью подтвердили это допущение [75, 82]. Приведенные данные позволяют определить ту долю выделенного нервными окончаниями АХ, которая оказывается в комплексе с рецепторами. Эта доля ($p$) рассчитывается по уравнению

$$p = \frac{t_1 - t_2}{t_1 - vt_2},$$

где $t_1$ — постоянная времени угасания токов до введения агента, оккупирующего рецепторы; $t_2$ — постоянная времени угасания токов в присутствии блокирующего агента; $v$ — фактор подавления $p$ в присутствии блокатора. Величины $p$, полученные в ряде лабораторий, позволяют считать, что бóльшая часть (около 60%) выделяющегося АХ в присутствии ингибитора эстеразы связывается рецепторами [75, 82]. Присутствие ингибиторов эстеразы оказывает лишь слабое стимулирующее влияние на величины токов, индуцируемых выделяющимся из нервных окончаний АХ [20, 82]. Поэтому можно полагать, что и в отсутствие ингибиторов холинэстеразы с рецепторами связываются около половины всего выделяющегося АХ.

## Д. Кооперативность

Имеются четыре независимые группы фактов, которые свидетельствуют о том, что в активации ионных каналов постсинаптических мембран определенное значение может иметь феномен кооперативности. Первый и наиболее изученный факт заключается в наличии зоны возрастающего наклона кривой зависимости доза — ответ (в линейных координатах) при действии АХ и других деполяризующих агентов на нервно-мышечные контакты и соединения нервов с электрическими пластинами. В ряде случаев наклон такой кривой в координатах Хилла достигает значения 2 [83, 84] и даже 3 [45], что указывает на наличие в процессе активации рецепторно-канальных молекул определенного пункта, в котором сходятся несколько реакций. Эти данные, однако, не говорят о том, что кооперативность имеет место именно на уровне взаимодействия АХ с рецепторами. О второй группе фактов мы уже упоминали: на каждую рецепторную молекулу приходится 2—4 места связывания АХ. Совершенно очевидно, что это может служить основой для возникновения положительной и (или) отрицательной кооперативности. Третья группа фактов заключается в обнаружении эффекта кооперативности в связывании и (или) задержке АХ изолированными фрагментами постсинаптических мембран [62, 66, 69, 86]. Эти результаты ясно показывают, что кооперативность на уровне взаимодействия АХ с рецепторами действительно

имеет место. Интересно, что после отделения рецепторных молекул от мембран с помощью детергентов положительная кооперативность исчезает. Имеющиеся данные позволяют также предполагать существование отрицательной кооперативности (т. е. связывание и (или) задержка молекулы АХ в одном связывающем месте подавляются в результате связывания и (или) задержки другой молекулы АХ в другом связывающем месте); эти же наблюдения можно, однако, объяснить и наличием двух типов мест связывания АХ с различным сродством к медиатору [66, 69]. Четвертая группа фактов получена в экспериментах по определению скорости угасания токов концевой пластинки в присутствии эстеразных ингибиторов. Как отмечалось выше, соединения, снижающие количество свободных рецепторов, вызывают ускорение процесса угасания токов концевой пластинки за счет снижения вероятности взаимодействия АХ с рецепторами до момента выхода молекул АХ из синаптической щели. Можно было бы ожидать, что увеличение количества молекул АХ в синаптической щели при повышении количества выделяемого нервами медиатора или при введении АХ и (или) его аналогов в окружающий мышцу раствор также должно снижать количество свободных рецепторов, и за счет этого ускорять процесс угасания токов концевой пластинки. В эксперименте же наблюдалась обратная картина: в присутствии неостигмина увеличение концентрации АХ в синаптической щели не только не ускоряло процесса угасания токов концевой пластинки, а, наоборот, удлиняло его [82]. Для объяснения этих фактов была чества выделяемого нервами медиатора или при введении АХ облегчает связывание и (или) задержку другой молекулы. На этом основании можно заключить, что между рецепторами и АХ возможны кооперативные взаимодействия, хотя такие взаимодействия не обязательно должны проявляться во всех случаях.

С точки зрения геометрии молекул вполне допустимо, что молекулы токсина (имеющие мол. вес около 8000 и соответственно диаметр 2,0—3,0 нм) взаимодействуют с отдельными рецепторными субъединицами. Места связывания ацетилхолина, вероятно, также расположены на разных субъединицах. Поэтому кооперативность на уровне взаимодействия АХ с рецепторами отражает, очевидно, межрецепторные взаимодействия.

## Е. Исчезновение чувствительности

Хорошо известно, что при длительном действии, и особенно при высоких концентрациях, эффективность АХ и других агонистов падает. Было выдвинуто предположение, что в присутствии агонистов рецепторы претерпевают трансформацию в неактивную, лишенную чувствительности форму. Ряд данных, указывающих на изменение конформации лишенных чувствительности рецепторов, приведен ниже, в разд. Ж.

Понятие «исчезновение чувствительности» охватывает по крайней мере два различных феномена. «Быстрое исчезновение чувствительности» наблюдается после ионофоретической аппликации АХ (скажем, в район концевой пластинки лягушки) в количестве, достаточном для деполяризации на 0,5—1 мв в течение 10—20 с или на 10—20 мв в течение нескольких секунд. При этом происходит потеря чувствительности на 50% и более. После удаления АХ чувствительность восстанавливается с полупериодом 2—7 с [85]. «Медленное исчезновение чувствительности» имеет место при погружении мышцы в раствор агониста; полупериоды исчезновения и восстановления чувствительности в этом случае измеряются минутами. Так, при концентрации карбахола, достаточной для деполяризации мышц лягушки максимум на 10—15 мв в течение нескольких минут, наблюдается заметное снижение чувствительности на протяжении десятков минут. В этот период уровень деполяризации почти стабилен и составляет величину около 5 мв. Возможно, это отражает равновесие между скоростями инактивации и реактивации рецепторов [87].

Остается неясным, обязательно ли активация рецепторов связана с потерей чувствительности или же инактивация является самостоятельным процессом. Поскольку деполяризация на 10 мв способна сохраняться в течение нескольких минут, можно рассчитать, что в этих условиях цикл работы рецепторов длится в среднем одну секунду (см. разд. VI). Поэтому возможно, что либо активация рецепторов не всегда заканчивается потерей чувствительности, либо период между началом и окончанием процесса исчезновения чувствительности длится гораздо меньше секунды, то есть быстрее, чем наблюдалось в эксперименте. В связи с этим уместно вспомнить, что строгих доказательств исчезновения чувствительности после нервной стимуляции в отсутствие ингибиторов эстераз не получено. Например, эффект исчезновения чувствительности не наблюдался в портняжной мышце лягушки и в диафрагме крысы через 80—180 мс после 8—10 нервных импульсов с частотой 50 гц, а также в мышцах лягушки через 500 мс после 10 импульсов с частотой 50 гц в присутствии простиглина [88]. Расчеты показывают, что в последнем случае активировалось 40% рецепторно-канальных молекул (3 акта связывания×135 000 каналов× ×10 импульсов, полагая, что популяция рецепторных молекул концевой пластинки состоит из 10 млн. молекул). Эти факты можно было бы объяснить тем, что при относительно низких концентрациях АХ (или других агонистов), вносимого экспериментатором или попадающего в синаптическую щель естественным путем в условиях нормальной нервно-мышечной передачи (в последнем случае после активации рецепторов свободный АХ уничтожается холинэстеразой), открытие каналов обусловлено взаимодействием в среднем одной молекулы АХ с одной рецепторно-канальной молекулой. В результате исчезновение чувствительности оказывается

минимальным, а (или) ее восстановление происходит очень быстро. При высоких же концентрациях АХ, действующих достаточно долго, связывание АХ носит кооперативный характер, что приводит к более полной или более длительной потере чувствительности. В связи с этим можно напомнить, что некоторые аналоги АХ, такие, как SKF-525A, не обладающие или обладающие низкой агонистической активностью, вызывают очень быстрое исчезновение чувствительности [72, 87]. Однако точно такой же эффект могут оказывать и другие соединения, не имеющие явного структурного сходства с АХ (например, гистрионикотоксин) [89].

Независимо от того, является или не является исчезновение чувствительности одной из стадий естественного процесса активации рецепторов и их восстановления, значение инактивации, по-видимому, лучше всего может быть отражено моделью циклического функционирования рецепторов. Кац и Теслефф [85], а также другие исследователи [72, 90] заметили, что скорость процесса исчезновения чувствительности зависит от концентрации действующего на постсинаптические мембраны агониста и что этот процесс может протекать намного быстрее восстановления чувствительности. С другой стороны, скорость восстановления не зависит ни от концентрации агониста и его эффективности, ни от скорости и глубины процесса исчезновения чувствительности. Для объяснения обнаруженных явлений было выдвинуто предположение о том, что для комплексов агонистов (А) с инактивированными рецепторами (*Рц) характерна низкая скорость диссоциации и что свободные, но лишенные чувствительности рецепторы подвергаются реактивации в исходную форму (Рц) с постоянной скоростью:

$$\mathrm{A} + \text{Рц} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} \text{АРц}$$

$$k_r \uparrow \qquad k_d \downarrow$$

$$\mathrm{A} + {}^{*}\text{Рц} \underset{k_2'}{\overset{k_1'}{\rightleftarrows}} \mathrm{A}{}^{*}\text{Рц},$$

где

$$\frac{k_1'}{k_2'} > \frac{k_1}{k_2} \text{ и } \frac{k_1' + k_2}{k_2' + k_1} \gg \frac{k_d}{k_r}.$$

Остается неизвестным, является ли образование комплекса АРц конечным этапом, вызывающим открытие каналов? Неизвестно также, могут ли дополнительные этапы приводить к формированию комплекса А*Рц, и если могут, то всегда ли? Совершенно ясно, однако, что данная модель должна учитывать возможность взаимодействия с каждой рецепторно-канальной молекулой 2—4 молекул агониста, т. е. $A^n + RRRC \rightleftarrows A^nRRRC$, и т. д.

Следует отметить, что, помимо этих реакций, которые, как полагают, происходят на уровне агонист-рецепторных взаимодействий, на процесс исчезновения чувствительности могут оказывать влияние и другие факторы, включая уровень поляризации мембраны и температуру [72].

### Ж. Конформационные изменения

Имеются по крайней мере три группы фактов, указывающих на то, что рецепторы могут находиться в нескольких конформационных состояниях. Сюда относятся, во-первых, данные о кооперативных взаимодействиях, свидетельствующие о способности вызываемых АХ изменений в одной субъединице оказывать влияние на связывание и (или) задержку АХ на другом участке той же рецепторной молекулы. Во-вторых, в условиях, приводящих к значительной потере чувствительности, связывание α-бунгаротоксина падает [21]. В-третьих, связывание алкилированного производного декаметония растет пропорционально степени потери чувствительности [90]. Этот факт свидетельствует о том, что рецепторы могут быть необратимо стабилизированы по крайней мере в двух состояниях. Поскольку ни одно из этих состояний не связано с длительной деполяризацией, можно думать, что существует также такое состояние рецепторов, которое связано с открытием каналов. Однако участие рецепторных субъединиц в этом процессе не является обязательным. Кроме того, на основании изучения эффективности ряда аффинных восстановителей и окислителей можно полагать, что расстояние между местом связывания АХ и S—S-мостиком в рецепторах, находящихся в чувствительной к АХ форме, короче, чем в рецепторах, лишенных чувствительности [13, 42]. Наконец, зависимость проводимости каналов, индуцированных АХ, от мембранного потенциала указывает на функционирование запирающего каналы механизма по типу простого диполя [78].

### З. Неполное насыщение мест связывания ацетилхолина

Наличие в рецепторной молекуле более одного ацетилхолинового и токсинового связывающего места позволяет поставить следующий вопрос: что происходит в случае, когда не все связывающие места рецепторной молекулы заняты агонистом или антагонистом? На этот вопрос можно ответить, сопоставив различные и на первый взгляд часто несопоставимые данные. Вот эти факты с некоторыми комментариями:

*1.* Как уже отмечалось, АХ, видимо, способен кооперативно связываться рецепторами и активировать их. В частности, при наиболее низких концентрациях АХ активация каналов происходит, очевидно, при неполном насыщении участков АХ.

*2.* Зависимость амплитуды одиночного потенциала концевой пластинки от времени после воздействия на мышцы α-бунгаротоксина в полулогарифмических координатах носит линейный характер [21]. Изучение кинетики связывания α-нейротоксинов с рецепторами показало, что этот процесс является простой бимолекулярной реакцией [59, 62, 63, 91]. α-Бунгаротоксин, видимо, снижает частоту элементарных актов изменения проницаемости, но не их амплитуду [76]. Первые два факта свидетельствуют о том, что токсины взаимодействуют с однородным классом связывающих мест и что при этом взаимодействии кооперативность отсутствует. Два последних наблюдения позволяют думать, что даже неполное насыщение мест связывания токсинов является достаточным для резкого снижения вероятности активации каналов.

*3.* Нейротоксины способны полностью подавлять связывание АХ рецепторами, находящимися в составе мембран или в растворе. Аналогичным образом АХ в совокупности с неостигмином может защищать по меньшей мере 80% токсиновых мест связывания в интактной мышце [21], а карбахол, никотин, декаметоний и кураре блокируют связывание токсинов рецепторами изолированных мембран и солюбилизированных препаратов [40, 41, 59, 62, 86, 91, 92]. Эти данные свидетельствуют о том, что места связывания агонистов и антагонистов находятся на одних и тех же рецепторах.

*4.* Одной группой исследователей [92] было обнаружено, что перед необратимым связыванием α-бунгаротоксина, происходящим со скоростью $k$, токсин сначала связывается обратимо с константой диссоциации $K_{\text{токс}}$. Эти авторы нашли, что кураре влияет лишь на величину $K_{\text{токс}}$; следовательно, кураре конкурирует с токсином за одни и те же места. В то же время карбахол и декаметоний оказывали влияние лишь на величину $k$ и, следовательно, не конкурировали с токсином за места связывания. (Возможно, эти соединения изменяли величину $k$ за счет влияния на конформацию рецепторов.)

*5.* В другом исследовании [91] было показано, что кураре и никотин подавляют связывание α-нейротоксина по типу «гиперболического конкурентного торможения» некоторых ферментов. Это указывает на возможность одновременного связывания и данных соединений, и токсинов. Было обнаружено также, что кураре не особенно эффективен для элюции рецепторных молекул, сорбированных на аффинной смоле, содержащей в качестве лиганда токсин. Полученные результаты сопоставимы с приведенными в предыдущем параграфе в том плане, что никотин в данном случае действует как блокатор связывающих мест, а не как деполяризующий агент и что никотин и кураре могут находиться в комплексе с рецептором одновременно с токсином, располагающимся на другой субъ-

единице. С другой стороны, для элюции рецепторов с аффинного матрикса можно, как оказалось, использовать декаметоний, причем это соединение действует по типу «линейной конкуренции», что указывает на невозможность одновременного связывания одной молекулой рецептора и токсина, и декаметония. Этот факт в совокупности с результатами, описанными в предыдущем параграфе (*4*), позволяет предполагать, что изменение конформации рецепторной молекулы деполяризующим агентом является более эффективным способом предотвратить связывание токсина, чем конкуренция за неизмененные участки.

*6.* При не слишком длительной экспозиции интактных мышц с кураре, присутствующим в концентрации, на несколько порядков более высокой, чем это требуется для достижения полной блокады нервно-мышечной передачи, защитное действие кураре распространяется часто лишь на часть (около половины) мест связывания токсина [21, 89]. Исследование чувствительности мышц с необратимо выключенными, резистентными к кураре местами (после отмывки кураре и несвязанного токсина) показало, что в этих условиях АХ все еще способен вызывать некоторую деполяризацию [89]. Таким образом, частичное выключение мест связывания АХ, хотя и может приводить к резкому снижению вероятности активации каналов, все же не снимает полностью действия АХ. Гистрионикотоксин также обладает способностью частично защищать связывающие места от действия α-нейротоксинов, причем после выключения бунгаротоксином резистентных к гистрионикотоксину связывающих мест мышц остающиеся места связывания оказываются даже менее чувствительными к АХ, чем в случае использования кураре [89].

*7.* Гистрионикотоксин [89] и аналоги АХ, адифенин и SKF-525 [72, 87], ускоряют исчезновение чувствительности, вызываемое АХ и карбахолом.

### Реконструкция

Ряду исследователей из разных лабораторий [49, 93, 94] удалось доказать возможность получения реконструированных рецепторно-мембранных комплексов. Для этого из выделенных с помощью детергентов растворимых препаратов рецепторов в присутствии липидов удаляли детергент и в результате получали везикулы с включенными в их состав рецепторами. Связывание токсина такими везикулами сохранялось в той степени, в которой этого можно было ожидать в каждом конкретном случае (в зависимости от того, ориентированы ли места связывания АХ случайным образом [40], или же они ориентированы к наружной поверхности везикул [94]). Это указывает на отсутствие изменений в конформа-

ции той части рецепторов, которая взаимодействовала с токсинами. Реконструированные везикулы в качественном отношении существенно не отличались от исходных везикул по способности реагировать на АХ изменением проницаемости к натрию. Реконструкция с использованием очищенных рецепторных молекул и демонстрация канальных свойств полученных частиц в отношении катионов являются наиболее прямым доказательством идентичности рецепторных молекул и образующих каналы структур [94].

## VI. АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

### А. Свободные молекулы рецепторов

Из 10 млн. рецепторно-канальных молекул, входящих в состав концевой пластинки (см. предыдущие разделы), во время максимального развития потенциала концевой пластинки портняжной мышцы лягушки открыто, по-видимому, 135 000 каналов [77]. Таким образом, имеющиеся рецепторно-канальные молекулы теоретически могли бы обеспечить 75 актов нервно-мышечной передачи без восстановления активности рецепторов.

### Б. Повторная активация рецепторов

На основании данных о средней продолжительности элементарного акта изменения проницаемости под действием АХ и о величине индуцируемой проводимости можно подсчитать, что для поддержания деполяризации в 10 мв в течение 1 с необходимо около 10 млн. рецепторов (ср. [21]). Поскольку на концевую пластинку портняжной мышцы лягушки приходится около 10 млн рецепторно-канальных молекул, а состояние деполяризации в 10 мв может поддерживаться в течение многих минут [87], рецепторно-канальные молекулы могут, очевидно, использоваться многократно, в среднем каждую секунду.

### В. Исчезновение чувствительности

Поскольку рецепторно-канальные молекулы могут активироваться в среднем каждую секунду, потеря их чувствительности либо не должна длиться дольше секунды, либо не всегда сопровождает активацию. При ионофоретической аппликации АХ в область концевых пластинок лягушки в количестве, достаточном для деполяризации на 10 мв, большая часть рецепторов в области кончика пипетки (скажем, 1 млн) за несколько секунд действительно теряет чувствительность, а период их полувосстановления составляет вначале 2—7 с [85]. Можно было бы ожидать поэтому, что либо рецепторы теряют чувствительность после не более 10-кратного использования, либо высокие концентрации АХ вызывают исчезно-

вение чувствительности, длящееся дольше или имеющее другую природу по сравнению с исчезновением чувствительности при действии более низких концентраций АХ. Ионофоретическое нанесение АХ в количестве, вызывающем первоначальную деполяризацию приблизительно на 1 мв, очевидно, приводит к активации такого же количества рецепторов, что и погружение мышцы в раствор с такой концентрацией АХ, которая вызывала деполяризацию в 10 мв. Но в то же время первоначальный период полувосстановления рецепторов при локальном нанесении АХ, по-видимому, оставался равным 2—3 с. Совершенно очевидно, что для объяснения этих фактов необходимо дальнейшее изучение феномена исчезновения чувствительности.

### Г. Эффективность использования ацетилхолина

Как уже отмечалось (разд. V, *Г*), изучение вопроса о доле выделенного АХ, которая участвует в активации каналов в присутствии ингибиторов эстераз, позволило предположить, что активны 60% молекул АХ. В отсутствие ингибиторов холинэстеразы по крайней мере половина выделенного медиатора также активна.

Учитывая способность рецепторной молекулы связывать от одной до четырех молекул АХ, можно показать, что для открытия 135 000 каналов достаточно выделения нервным окончанием $3 \cdot 10^5$—$10 \cdot 10^5$ молекул АХ. (Это количество АХ сопоставимо с величиной $2 \cdot 10^6$—$4 \cdot 10^6$ молекул АХ на импульс, полученной путем измерения АХ, собранного из диафрагмы крыс после передачи 360 импульсов в присутствии ингибитора эстеразы [2]). В результате выделения нервным окончанием порядка $10^6$ молекул АХ в постсинаптическую клетку входит суммарно около $10^{10}$ ионов — этот эффект усиления сигнала при химической нервно-мышечной передаче, безусловно, впечатляющ.

### Д. Кооперативность

В настоящее время мы не имеем возможности проанализировать значение кооперативности связывания или задержки АХ. Это обусловлено в первую очередь тем, что пока неизвестно, определяет ли множественность мест связывания точную уравновешенность постсинаптических ответов и их высокую эффективность, позволяет ли кооперативность задержки избегать чрезмерных реакций, или же кооперативность может определять и то и другое. Вполне допустимо, что осуществляются обе возможности, т. е. что кооперативные рецепторные взаимодействия дают возможность связаться большему количеству молекул АХ, каналам — открыться шире и на более продолжительное время, а при более высоком уровне связывания — удлинить пребывание рецепторов в неактивном состоянии. Любая рецепторная модель должна, очевидно, учитывать

взаимодействия между двумя типами молекул (АХ и рецепторов), существование 2—4 субъединиц, способных связывать АХ, и наличие по крайней мере двух конформационных состояний рецепторных молекул.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. *Katz B.*, Nerve, Muscle and Synapse, McGraw-Hill, New York, 1966. [Имеется перевод: Катц Б. Нерв, мышца и синапс. — М.: Мир, 1969.]
2. *Potter L. T.*, J. Physiol. (Lond.). *206*, 145—166 (1970).
3. *Bennett M. V. L.*, Fish Physiol., *5*, 347—491 (1971).
4. *Fatt P., Katz B.*, J. Physiol. (Lond.), *115*, 320—370 (1951).
5. Ciba Symposium, Molecular Properties of Drug Receptors (R. Porter and M. O'Connor, eds.), Churchill, London, 1970.
6. Biological Council Symposium, Drug Receptors (H. P. Rang, ed.), Macmillan, London, 1973.
7. American Society for Neurochemistry Monograph, Neurochemistry of Cholinergic Receptors (E. de Robertis and J. Schacht, eds.), Raven Press, New York, 1974.
8. Symposium, Fed. Proc., в печати.
9. *O'Brien R. D., Eldefrawi M. E., Eldefrawi A. T.*, Annu. Rev. Pharmacol., *12*, 19—34 (1972).
10. *Hall Z. W.*, Annu. Rev. Biochem., *41*, 925—952 (1972).
11. *Potter L. T.*, Methods Enzymol., *38B*, 309—322 (1974).
12. *Landowne D., Potter L. T., Terrar D. A.*, Annu. Rev. Physiol., *37*, 485—508 (1975).
13. *Karlin A.*, Life Sci., *14*, 1385—1415 (1974).
14. *Langley J. N.*, J. Physiol. (Lond.), *36*, 347—384 (1907).
15. *Paton W. D. M.*, See Ref. 5, pp. 3—30.
16. *Miledi R.*, J. Physiol. (Lond.), *151*, 1—23 (1960).
17. *Miledi R.*, J. Physiol. (Lond.), *151*, 24—30 (1960).
18. *Kuffler S. W., Yoshikami D.*, J. Physiol. (Lond.), *244*, 703—730 (1975).
19. *Katz B., Miledi R.*, J. Physiol. (Lond.), *170*, 370—388 (1964).
20. *Takeuchi A., Takeuchi N.*, J. Neurophysiol., *22*, 395—411 (1959).
21. *Miledi R., Potter L. T.*, Nature, *233*, 599—603 (1971).
22. *Berg D. K., Kelly R. B., Sargent P. B., Williamson P., Hall Z. W.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 147—151 (1972).
23. *Salpeter M. M., Eldefrawi M. E.*, J. Histochem. Cytochem., *21*, 769—778 (1973).
24. *Fambrough D. M.*, See Ref., *7*, pp. 85—113.
25. *Lee C. Y., Tseng L. F., Chiu T. H.*, Nature, *215*, 1177—1178 (1967).
26. *Anderson M. J., Cohen M. W.*, J. Physiol. (Lond.), *237*, 385—400 (1974).
27. *Bourgeois J.-P., Tsuji S., Boquet P., Pillot J., Ryter A., Changeux J.-P.*, FEBS Lett., *16*, 92—94 (1971).
28. *Barnard E. A., Wiekowski J., Chiu T. H.*, Nature, *234*, 207—209 (1971).
29. *Bourgeois J.-P., Ryter A., Menez A., Fromageot P., Boquet P., Changeux J.-P.*, FEBS Lett., *25*, 127—133 (1972).
30. *Fertuck H. C., Salpeter M. M.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *71*, 1376—1378 (1974).
31. *Barnard E. A.*, See Ref., 8, в печати.
32. *Rash J. E., Ellisman M. H.*, J. Cell Biol., *63*, 568—581 (1974).
33. *Heuser J. E., Feese T. S., Landis D. M. D.*, J. Neurocytol., *3*, 109—123 (1974).
34. *Nickel E., Potter L. T.*, Brain Res., *23*, 95—100 (1970).
35. *Orci L., Perrelot A., Duant Y.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *71*, 307—310 (1974).
36. *Allen T., Baerwald R., Potter L. T., Nickel E.*, J. Cell Biol., *63*, 6a (1974).
37. *Allen T., Chang R., Potter L. T.*, in: Biomemnranes-Lipoproteins and Receptors (R. M. Burton and L. Packer, eds.), Bi-Science Publications Webster Groves, Mo., pp. 132—143 (1975).

38. *Rosenbluth J.*, J. Cell Biol., *62*, 755—766 (1974).
39. *Waser P. G.*, See Ref., 5, pp. 59—69.
40. *Changeux J.-P., Meunier J.-C., Olsen R. W., Weber M., Bourgeois J.-P., Popot J.-L., Cohen J. B,. Hazelbauer G. L., Lester H. A.*, See Ref., 6, pp. 273—294.
41. *O'Brien R. D., Eldefrawi M. E., Eldefrawi A. T.*, See Ref., 6, pp. 241—256.
42. *Karlin A., Cowburn D. A.*, See Ref., 7, pp. 37—48.
43. *Miledi R., Molinoff P., Potter L. T.*, Nature, *229*, 554—557 (1971).
44. *Lee C. Y.*, Annu. Rev. Pharmacol., *12*, 265—281 (1972).
45. *Dreyer F., Peper K.*, Nature, *253*, 641—643 (1975).
46. *Chiu T. H., Dolly J. O., Barnard E. A.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *51*, 205—213 (1973).
47. *Chang C. C., Cheu T. F., Chuang S.-T.*, Br. J. Pharmacol., *47*, 147—160 (1973).
48. *Bosmann H. B.*, J. Biol. Chem., *247*, 130—145 (1972).
49. *Potter L. T.*, See Ref., 6, pp. 295—312.
50. *Allen T., Chang R., Potter L. T.* (В печати.)
51. *Berman J. D.*, Biochemistry, *12*, 1710—1715 (1973).
52. *Hall Z. W.*, See Ref., 8, в печати.
53. *Massoulié J., Rieger F., Bon S.*, Eur. J. Biochem., *21*, 542—551 (1971).
54. *Guth L., Brown W. C., Watson P. K.*, Exp. Neurol., *18*, 443—452 (1967).
55. *Vogel Z., Sytkowski A. J., Nirenberg M. W.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *69*, 3180—3184 (1972).
56. *Steinbach J. H., Harris A. J., Patrick J., Schubert D., Heinemann S.*, J. Gen. Physiol., *62*, 255—270 (1973).
57. *Cohen M. W.*, See Ref., 8, в печати.
58. *Lomo T., Rosenthal J.*, J. Physiol. (lond.), *221*, 493—513 (1972).
59. *Franklin G. I., Potter L. T.*, FEBS Lett., *28*, 101—106 (1972).
60. *Molinoff P. B., Potter L. T.*, Adv. Biochem. Psychopharmacol., *6*, 111—134 (1972).
61. *Kato G., Tattrie B.*, FEBS Lett., *48*, 26—31 (1974).
62. *Meunier J.-C., Sealock A., Olsen R., Changeux J.-P.*, Eur. J. Biochem., *45*, 371—394 (1974).
63. *Klett R. P., Fulpius B. W., Cooper D., Smith M., Reich E., Possani L. D.*, J. Biol. Chem., *248*, 6841—6853 (1973).
64. *Biesecker G.*, Biochemistry, *12*, 4403—4408 (1973).
65. *Ong D. E., Brady R. N.*, Biochemistry, *13*, 2822—2827 (1974).
66. *Eldefrawi M. E., Eldefrawi A. T.*, Arch. Biochem. Biophys., *159*, 362—373 (1973).
67. *Hucho F., Changeux J.-P.*, FEBS Lett., *38*, 11—15 (1973).
68. *Nickel E., Potter L. T.*, Brain Res., *57*, 508—517 (1973).
69. *Chang R., Potter L. T.*. (В печати.)
70. *Weill C. L., McNamee M. G., Karlin A.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *61*, 997—1003 (1974).
71. *Singer S. J.*, Hosp. Practice, *8*, 81—90 (1973).
72. *Magazanik L. G., Vyskocil F.*, See Ref., 6, pp. 105—119.
73. *Katz B., Miledi R.*, J. Physiol. (Lond.), *224*, 665—699 (1972).
74. *Katz B., Miledi R.*, J. Physiol. (Lond.), *230*, 707—717 (1973).
75. *Katz B., Miledi R.*, J. Physiol. (Lond.), *231*, 549—574 (1974).
76. *Katz B., Miledi R.*, J. Pharmacol., *49*, 138—139 (1973).
77. *Anderson C. R., Stevens C. F.*, J. Physiol. (Lond.), *235*, 655—691 (1973).
78. *Magleby K. L., Stevens C. F.*, J. Physiol. (Lond.), *223*, 151—171 (1972).
79. *Magleby K. L., Stevens C. F.*, J. Physiol. (Lond.), *223*, 173—197 (1972).
80. *Colquhoun D., Dionne V. E., Steinbach J. H., Stevens C. F.*, Nature, *253*, 204—206 (1975).
81. *Landau E. M., Ben-Haim D.*, Science, *185*, 944—946 (1974).
82. *Magleby K. L., Terrar D. A.*, J. Physiol. (Lond.), *244*, 467—495 (1975).
83. *Rang H. P.*, Nature, *231*, 91—96 (1971).
84. *Podleski T. R.*, See Ref., 6, pp. 135—148.
85. *Katz B., Thesleff S.*, J. Physiol. (Lond.), *138*, 63—80 (1957).

86. *Moody T., Schmiadt J., Raftery M.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *53*, 761—772 (1973).
87. *Terrar D. A.*, Br. J. Pharmacol., *51*, 259—268 (1974).
88. *Otsuka M., Endo M., Nonomura Y.*, Jap. J. Physiol., *12*, 573—584 (1962).
89. *Albuquerque E. X., Barnard E. E., Chiu T. H., Lapa A. J., Dolly J. O., Jansson S.-E., Daly J., Witkop B.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *70*, 949—953 (1973).
90. *Rang H. P., Ritter J. M.*, Mol. Pharmacol., *6*, 357—382 (1970).
91. *Fulpius B. W., Klett A. P., Reich E.*, See Ref., 7, pp. 19—29.
92. *Bulger J. E., Hess G. P.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *54*, 677—684 (1973).
93. *Hazelbauer G. L., Changeux J.-P.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *71*, 1479—1483 (1974).
94. *Michaelson D. M.. Raftery M. A.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *71*, 4768—4772 (1974).
95. *Patrick J., Boulter J., O'Brien J. C.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., *64*, 219—225 (1975).
96. *Raftery M. A., Vandlen R. L., Lee T., Moody T., Reed K.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, в печати.

# ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Под редакцией Дж. Леви

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГОРМОНОВ С РЕЦЕПТОРАМИ

Ст. научн. ред. Л. Г. Тер-Саркисян и научн. ред. Т. И. Жиляева
Младший редактор О. А. Горгун
Художник А. Семенов. Художественный редактор Б. Н. Юдкин.
Технический редактор Н. И. Борисова. Корректор В. С. Соколов

ИБ № 1546

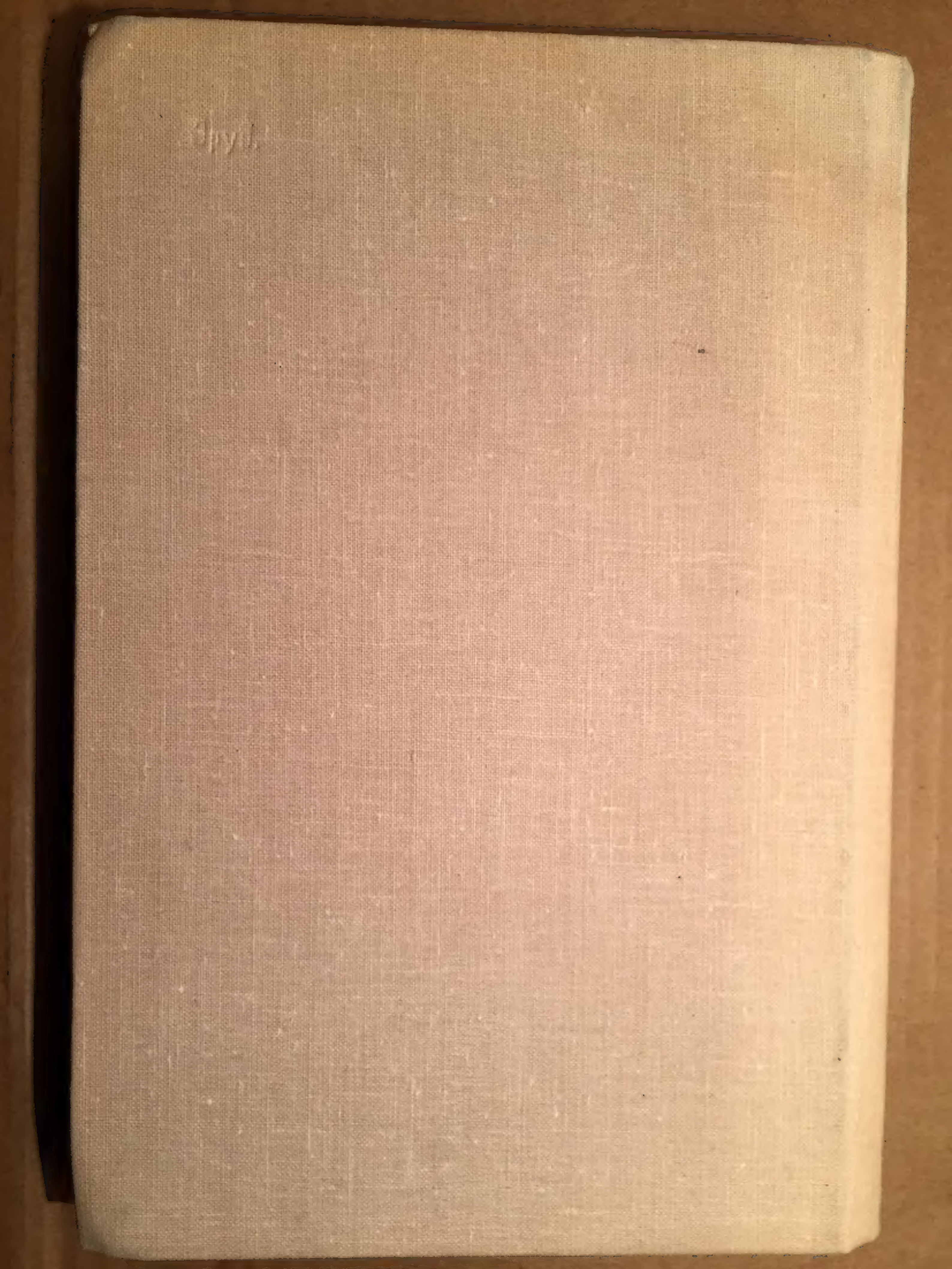
Сдано в набор 12.02.79. Подписано к печати 03.07.79. Формат 60×90$^{1}/_{16}$. Бумага типографская № 2. Гарнитура латинская. Печать высокая. Объем 13,5 бум. л. Усл. печ. л. 27. Уч.-изд. л. 30,23. Изд. № 4/9936. Тираж 5300 экз. Зак. № 882. Цена 3 р.

Издательство «Мир»

Москва, 1-й Рижский пер., 2

Владимирская типография «Союзполиграфпрома» при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли
600000, г. Владимир, Октябрьский проспект, д. 7






взаимодействие
гормонов с рецепторами